

**Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie
der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz**

**Stereologische Volumenbestimmung immunhistochemisch
differenzierter Strukturbestandteile der menschlichen Plazenta**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Antonia Bühlmeier
aus Schondorf am Ammersee

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter

apl. Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank

Mitberichterstatter

Prof. Dr. Udo Jeschke

Prof. Dr. Winfried Lange

Mitbetreuung durch promovierten
Mitarbeiter

Dr. rer nat. Eva Häußner

Dekan

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung

07.06.2018

Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz;

denn sie zeigt ihm seine Grenzen.

(Albert Schweizer)

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der stereologischen Untersuchung histologischer Präparate der gesunden menschlichen Plazenta. Dabei wurde eine immunhistochemische Färbetechnik angewandt, um die Unterscheidung verschiedener Abschnitte des plazentaren Zottenbaumes so objektiv und vom Untersucher unabhängig wie möglich zu gestalten. Die Ergebnisse der Studie sollen als Referenzdaten für Untersuchungen an pathologischen Plazenten dienen.

Durch eine spezifische immunhistochemische Färbetechnik gelang es das Protein „gamma-smooth-muscle (γ -sm)-Aktin“, welches lediglich in der perivaskulären Manschette sogenannter Stammzotten sowie in perivaskulären Myofibroblasten exprimiert wird, darzustellen. Die von dieser Manschette ummantelten Gefäße „Aktin positiver“ Zotten dienen demnach vorwiegend der Blutleitung zu den peripheren Austauschgebieten. „Aktin negative“ Zotten sind die peripheren Regionen des Zottenbaumes und überwiegend am Stoffaustausch beteiligt. So entsteht unabhängig von der klassischen histologischen Einteilung anhand des Zottendurchmessers und des Zottenstromas, eine Einteilung des Zottenbaumes nach immunhistochemischen Kriterien in „Aktin positive“ und „Aktin negative“ Zottentypen mit unterschiedlichen Funktionen.

Anhand von Vergleichen makroskopischer Daten der aktuellen Studie mit bereits publizierten Daten konnte gezeigt werden, dass die hier untersuchte Plazentapopulation dem Erwartungshorizont für Daten klinisch unauffälliger menschlicher Plazenten entspricht (siehe Kapitel 5.3).

Die aktuelle Studie zeigt, dass der Volumenanteil des Gefäßlumens in „Aktin negativen“ Zotten zur Nabelschnurinsertion hin steigt, parallel zum Volumenanteil des intervillösen Raumes, in dem das mütterliche Blut zirkuliert. Rund um die Nabelschnur finden sich daher Korrelate einer intensiveren Verzahnung mütterlicher und kindlicher Kreisläufe sowie einer möglicherweise in diesem Bereich höheren Austauschkapazität menschlicher Plazenten (siehe Kapitel 5.4).

Auch zwischen den mikroskopischen Strukturen konnten statistisch signifikante Korrelationen erkannt werden, sowohl innerhalb einer Gruppe (Gruppe der „Aktin positiven“ Strukturen bzw. Gruppe der „Aktin negativen“ Strukturen) als auch zwischen

den Gruppen. Insbesondere ist hervorzuheben, dass die kumulierten Volumenanteile „Aktin positiv“ und die kumulierten Volumenanteile „Aktin negativ“ negativ miteinander korrelierten, was für eine Expansion Aktin positiver Zotten auf Kosten Aktin negativer Strukturen und vice versa spricht. Des Weiteren korrelierte der Volumenanteil von Fibrinoid mit den kumulierten Volumenanteilen „Aktin positiv“ positiv, was zu der bekannten Ablagerung von Fibrinoid in Stammzotten passt und bestätigt, dass Aktin positive Zotten die in der klassischen histologischen Klassifikation als Stammzotten erfassten Zottenabschnitte mit abdecken (s. Kapitel 5.5).

Das Plazentagewicht als wichtiges Maß für die Einschätzung der intrauterinen Situation korreliert mit den Aktin positiven Zottenanteilen, nicht aber mit den Aktin negativen (siehe Kapitel 5.6).

Der Geburtsmodus zeigte sowohl auf mikroskopische als auch auf makroskopische Parameter der Plazenta einen signifikanten Einfluss. Bei Spontangeburt ergab sich ein signifikant geringerer Volumenanteil des Gefäßlumens in Aktin negativen Zotten und im intervillösen Raum. Auch das Plazentagewicht und die Dicke der Plazenta waren bei Spontangeburt signifikant niedriger. Das Geschlecht des Kindes zeigte weder auf mikroskopische noch auf makroskopische Parameter der Plazenta einen Einfluss (siehe Kapitel 4.3.1).

Fallzahlabschätzungen über Power-Analysen zeigten, dass für einige mikroskopische, aber auch makroskopische Parameter Gruppengrößen von etwa 100 Plazenten benötigt werden, um Mittelwertdifferenzen von 5 – 10% statistisch zu erfassen. Dies soll sowohl retrospektive Analysen publizierter Studien wie auch die prospektive Planung zukünftiger Studien unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis.....	8
II.	Tabellenverzeichnis.....	9
III.	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	10
1.	Einleitung.....	13
1.1.	Entwicklung der menschlichen Plazenta	13
1.2.	Aufbau der reifen menschlichen Plazenta und ihre Funktionen.....	16
1.3.	Wege zur quantitativen Analyse des Zottenbaums der menschlichen Plazenta	20
2.	Ziel der Arbeit	23
3.	Material und Methoden.....	24
3.1.	Studienmaterial.....	24
3.2.	Makroskopische Datenerhebung.....	25
3.3.	Gewebeentnahme durch „systematic random sampling“	26
3.4.	Immunhistochemie und Färben der Gewebeschnitte	29
3.5.	Volumenbestimmung durch „unbiased Stereology“	32
3.6.	Statistische Analyse	37
4.	Ergebnisse	39
4.1.	Deskriptive Statistik	39
4.2.	Ergebnisse der multivariaten Korrelationsanalysen.....	45
4.3.	Analyse ausgewählter Korrelationen	50
4.3.1.	Einfluss von Entbindungsmodus und Geschlecht	50
4.3.2.	Korrelation der Werte Aktin positiver Zotten mit Fibrinoid, makroskopischen und klinischen Parametern	50
4.3.3.	Korrelation der Volumina von Fibrinoid und intervillösem Raum mit anderen makroskopischen Parametern.....	52

4.4. Einfluss der Entfernung der Probe von Plazentarand und Nabelschnurinsektion	53
4.4.1. Einfluss der Entfernung der Probe vom äußeren Plazentarand	53
4.4.2. Einfluss der Entfernung der Probe von der Nabelschnurinsektion.....	54
4.5. Poweranalyse und Stichprobenumfang	54
5. Diskussion	57
5.1. Übersicht zur vorliegenden Studie.....	57
5.2. Zur Bedeutung der immunhistochemischen Unterteilung des Zottenbaumes	58
5.3. Vergleich der Daten der aktuellen Studie mit Literaturdaten	60
5.4. Intraplazentare Variabilität mikroskopischer Parameter	63
5.5. Korrelationen zwischen verschiedenen mikroskopischen Parametern	64
5.6. Korrelation mikroskopischer Parameter mit makroskopischen Parametern	65
5.7. Einfluß des kindlichen Geschlechts und des Entbindungsmodus auf die mikroskopischen Parameter.....	67
5.8. Fallzahlabseätzungen für zukünftige Studien	69
6. Literaturverzeichnis	71
7. Danksagung	79
8. Eidesstattliche Versicherung	80

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wachstums- und Reifungsvorgänge im Zottenbaum der menschlichen Plazenta.....	17
Abbildung 2: Schematischer Ablauf eines „systematic random sampling“ von Plazentaproben zur stereologischen Untersuchung.	26
Abbildung 3: Schematische Darstellung des projizierten Punkterasters auf einer Plazenta zur randomisierten Gewebeentnahme.....	27
Abbildung 4: Foto einer Plazenta mit den zugehörigen Probeentnahmepunkten.. ...	28
Abbildung 5: Histologischer Präparate einer Aktin positiven Zotte.	35
Abbildung 6: Histologischer Präparate einer Aktin negativen Zotte.....	36
Abbildung 7: Matrix-Scatterplot von mikroskopischen Parametern.....	46
Abbildung 8: Ergebnisse der Korrelationsanalyse in graphischer Darstellung.....	47
Abbildung 9: Erweiterte Ergebnisse der Korrelationsanalyse in graphischer Darstellung.	49
Abbildung 10: Boxplot Diagram von Aktin negativem Lumen und intervillösen Raum bei unterschiedlichem Entbindungsmodus.	50
Abbildung 11: Lineare Regressionsanalysen der Parameter Summe positiver Zotten und Aktin positives Stroma mit dem Plazentagewicht, Dicke der Plazenta und Fibrinoid.....	51
Abbildung 12: Lineare Regressionsanalyse der Parameter Fibrinoid / Plazentagewicht sowie intervillösen Raum / Plazentagewicht, intervillösen Raum / Plazentagewicht zu Geburtsgewicht und intervillösen Raum / Dicke der Plazenta... ..	52
Abbildung 13: Zusammenhang der mikroskopischer Parameter intervillöser Raum und Aktin negative Lumen mit dem jeweiligem Abstand der Gewebeprobe zum äußeren Rand der Plazenta.....	53
Abbildung 14: Fallzahlabeschätzung.	56

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung des Kapillarendothels.	30
Tabelle 2: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung der perivaskulären Manschette über γ -sm-Aktin.	31
Tabelle 3: Deskriptive Statistik von makroskopischen Parametern der gesamten Plazentapopulation.	40
Tabelle 4: Deskriptive Statistik von mikroskopischen Parametern der gesamten Plazentapopulation.	40
Tabelle 5: Deskriptive Statistik Aktin positiver Teilparameter.	41
Tabelle 6: Deskriptive Statistik Aktin negativer Teilparameter.	42
Tabelle 7: Deskriptive Statistik der Teilparameter Fibrinoid, intervillöser Raum und undefinierte Strukturen.	43
Tabelle 8: Aus Tabelle 5 abgeleitete Summenparameter Summe Aktin positiver Zotten, Summe Aktin negativer Zotten und Summe aller Zotten.	44
Tabelle 9: Vergleich des ermittelten Plazentagewichts zu bisher veröffentlichten Daten.	63

III. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Makroskopische und klinische Bezüge

DICKE	Dicke der Plazenta (cm), gemessen von der Chorionplatte bis zur Basalplatte der Plazenta
Dist.	Distanz (cm) der Probeentnahmestelle zur Nabelschnur (Dist_NS) bzw. zum Rand der Plazenta (Dist_RD)
EM	Entbindungsmodus, (Art der Geburt: vaginal oder sectio caesarea)
GA	Gestationsalter (Wochen)
GENDER	Geschlecht des Kindes
GG	Geburtsgewicht des Kindes (g)
KDM	Kürzester Durchmesser der Plazenta, gemessen durch die Nabelschnur auf der Chorionplatte (cm)
LDM	Längster Durchmesser der Plazenta, gemessen durch die Nabelschnur auf der Chorionplatte (cm)
NS	Nabelschnur
OF	Choriale Oberfläche der Plazenta (cm ²)
PG	Gewicht der Plazenta (g), ohne Nabelschnur, mit Eihäuten
PG_GG_Ratio	Verhältnis von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht des Kindes
RD	Äußerer Rand der Plazenta
SSW	Schwangerschaftswoche

Stereologisch ermittelte Volumina

FIB	Fibrinoid (ml)
INTRO	Intervillöser Raum (Raum zwischen den Zotten, (ml))
negENDO	Gefäßendothel Aktin negativer Zotten (Volumen in ml)
negLUM	Gefäßlumen Aktin negativer Zotten (Volumen in ml)
negSTRO	Stroma Aktin negativer Zotten (Volumen in ml)
negSYN	Synzytium Aktin negativer Zotten (Volumen in ml)
posENDO	Gefäßendothel Aktin positiver Zotten (Volumen in ml)
posLUM	Gefäßlumen Aktin positiver Zotten (Volumen in ml)
posSTRO	Stroma Aktin positiver Zotten (Volumen in ml)
posSYN	Synzytium Aktin positiver Zotten (Volumen in ml)
SUnegZO	Summe aller Aktin negativer Zottenbestandteile (Volumen in ml)
SUposZO	Summe aller Aktin positiver Zottenbestandteile (Volumen in ml)
UNDEF	Strukturen ohne Zuordnung zum Zottenbaum, z.B. Chorionplatte, Basalplatte (Volumen in ml)

Sonstige Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin
dMW	Mittelwertdifferenz
hCG	humanes Chorion-Gonadotropin
p.c.	Post conceptionem (nach Konzeption)
PBS	Kochsalzlösung, phosphatgepuffert
PGF	placental growth factor
PVSM	Perivaskuläre Manschette

ROI	Region of Interest
SA	Standardabweichung
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
γ -sm-Aktin	γ – smooth muscle - Aktin

1. Einleitung

1.1. Entwicklung der menschlichen Plazenta

Die Plazenta ist ein temporäres Organ, das während der Schwangerschaft im Uterus die Ernährung und Versorgung des Kindes übernimmt. Sie besteht aus Abkömmlingen der äußeren epithelialen Hülle des frühen Embryos – dem Trophoblasten – und aus Bindegewebe, das aus dem extraembryonalen Mesoderm hervorgegangen ist. Aus diesen Ausgangsgeweben entwickelt sich ein komplexes, baumähnlich verzweigtes, gut kapillarisiertes Zottensystem, welches von mütterlichem Blut umspült wird. An der Oberfläche dieses Zottenbaums befindet sich die Blut-Plazenta-Schranke, die den mütterlichen und den kindlichen Blutkreislauf voneinander trennt. Die Blut-Plazenta-Schranke übernimmt die essentielle Aufgabe des Gas- und Nährstoffaustausches zwischen Mutter und Kind. Anfallende Stoffwechselprodukte des Kindes werden darüber abtransportiert. Nach der Geburt löst sich die Plazenta während der Nachwehen vom Uterus und wird zusammen mit den Eihäuten (Amnion und „amniochorionic membrane“ (s. u.)) als Nachgeburt ausgestoßen [Enders und King, 1988].

Die Grundstrukturen der menschlichen Plazenta entstehen durch rasch ablaufende Prozesse in der frühen periimplantativen Phase der menschlichen Entwicklung:

Nachdem sich aus der befruchteten Eizelle über mehrere Zwischenstadien (2-, 4-, 8-, 16- Zellstadium, anschließend Morula) die Blastozyste gebildet hat, erreicht der frühe Embryo zwischen dem 4.ten und 6.ten Tag p.c. das *cavum uteri*, in dem das Endometrium im Idealfall bereit für die Implantation ist [Kaufmann, 1990].

Zum Zeitpunkt der Implantation besteht die Blastozyste aus der inneren Zellmasse (Embryoblast), der Blastozystenhöhle (eine mit Flüssigkeit gefüllte Höhle) und einer äußeren epithelialen Begrenzung (Trophoblast).

Der Trophoblast ist das äußere epitheliale Hüllgewebe des Embryos, das während der ganzen Schwangerschaft die Grenze zwischen Mutter und Kind bilden wird. Im Rahmen der Implantation adhären Zellen des Trophoblasten zunächst über

Verbindungskomplexe am Endometrium [Kimber und Spanswick, 2000]. An dieser Stelle beginnt eine rasche Proliferation des Trophoblasten und einzelne Zellen des Trophoblasten fusionieren miteinander in ein synzytiales mehrzelliges Konstrukt, den Synzytiotrophoblasten [Frank, 2011; Enders et al., 1997].

Der Trophoblast beginnt mit der invasiven Destruktion des endometrialen Epithels, durchstößt die subepitheliale endometriale Basalmembran und dringt immer tiefer ins Stroma vor. Dabei bildet sich bereits die trophoblastäre Schichtung, die auch auf den Zotten typisch bleiben wird:

Die innere Lage des Trophoblasten hat direkten Kontakt zur subtrophoblastären Basalmembran, besteht aus Einzelzellen (den Zytotrophoblasten) und bleibt proliferationsfähig. Darüber findet sich eine durchgängige Schicht miteinander synzytial verschmolzener Zellen, der Synzytiotrophoblast [Enders, 1989], der als Gewebe ausdifferenziert und postmitotisch ist. So breitet sich das Synzytium durch kontinuierliche Proliferation des Zytotrophoblasten und weiterer Fusion dieser Tochterzellen mit dem Synzytium aus. Der Trophoblast wird rasch größer und arrodirt zunächst endometriale Drüsen, die während des ersten Trimesters der Schwangerschaft, die zu diesem Zeitpunkt überwiegend histiotrophe Ernährung des Embryos übernehmen [Sadler, 2008; Burton et al. 2002; Benirschke et al., 2012]. In einer nächsten Phase (ca. während des Übergangs vom ersten in das zweite Trimester der Schwangerschaft) beginnt in den Spalträumen (Lakunen) zwischen den sich bildenden Trophoblastverzweigungen (Zotten) mütterliches Blut zu strömen. Dies geschieht infolge trophoblastärer Invasion in die Wände der Spiralarterien und Eröffnung der Lumina dieser Arterien. Im Inneren der Zotten wächst aus dem Embryo stammendes extraembryonales Mesoderm voran und bildet das Bindegewebe des Zottenbaumes.

Die Bildung der Zotten in der Plazenta wird üblicherweise in drei formal trennbare und aufeinander folgende Schritte unterteilt:

- Primäre Zotten bestehen nur aus Trophoblastzapfen, wie sie in der Regel in der frühen invasiven Phase der Plazentation vorkommen.
- Sekundäre Zotten enthalten bereits Stroma, das sich aus dem extraembryonalen Mesoderm abgeleitet hat

- Tertiäre Zotten sind Zotten, in denen neben dem Stroma auch erste lokale Gefäßneubildungen zu beobachten sind.

Das kindliche Blut in den Zotten wird über die sich im Haftstiel und der Chorionplatte entwickelnden Gefäße mit dem intraembryonalen Blutkreislauf verbunden. Spätestens in der 10. Woche haben sich alle hämangiopoetischen Inseln des Zottenmesenchyms mit dem fetoplazentaren Gefäßnetz verbunden, wodurch ein kompletter fetoplazentarer Blutkreislauf entstanden ist [Burton et al., 1999].

Sobald sich die tertiären Zotten gebildet haben, beginnt das teilweise explosive Wachstum des Zottenbaumes, das der Hauptfaktor der Massenzunahme der Plazenta ist und im Wesentlichen als stromale und angiogenetische Reifung bezeichnet werden kann [Kaufmann et al., 2004]. Sie verläuft biphasisch [Mayhew, 2002]:

Phase I: Aus Trophoblastsprossungen an der Oberfläche entstehen gefäßfreie, aber durch Einwachsen von Mesenchym, bindegewebshaltige neue Zweige am Zottenbaum - die mesenchymalen Zotten. Sobald in diese Zotten Kapillaren aus dem Aussprossungsbereich eindringen, bilden sich auch die sogenannten Stromakanäle – mit Flüssigkeit gefüllte Hohlräume im Stroma – die zum typischen ödematös anmutenden Aspekt der sogenannten unreifen Intermediärzotten führen. Unreife Intermediärzotten können sich entweder durch Sprossung mesenchymaler Zotten weiter verzweigen, oder aber durch Umbau des Stromas unter Verlust der Stromakanäle und Ausbildung einer kontraktile Manschette in Stammzotten differenzieren. Das Einsprossen neuer Kapillaren in die mesenchymalen Zotten folgt im Wesentlichen dem Pfad der sogenannten „branching angiogenesis“, die von „placental growth factor“ (PGF) als wesentlichem Faktor kontrolliert wird. Die drei genannten Zottentypen (mesenchymale Zotten, unreife Intermediärzotten und Stammzotten) dominieren das Wachstum der menschlichen Plazenta bis ca. zur 20. Gestationswoche. Danach ändert sich das Wachstumsmuster deutlich.

Phase II: Unter dem dominanter werdenden Einfluss von „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) ändert sich das Muster der Angiogenese beim Auswachsen der Zottenkapillaren. Es dominiert jetzt die sogenannte „non-branching angiogenesis“. Mesenchymale Zotten differenzieren sich zunehmend nicht mehr in unreife Intermediärzotten, sondern in längliche, mit sinusoidalen Kapillaren ausgestattete reife Intermediärzotten. An reifen Intermediärzotten entstehen allerdings keine

mesenchymalen Zotten mehr. Stattdessen kommt es unter der massiven Längenzunahme der Kapillaren zu Ausstülpungen von Kapillaren in kleine stromaarme Zotten, den sogenannten Terminalzotten. Da der Prozess der Umwandlung unreifer Intermediärzotten in Stammzotten weitergeht, wird die Möglichkeit der Plazenta, ganz neue Zottenzweige anzulegen, ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) zunehmend eingeschränkt. Nichtsdestotrotz bilden sich an der Oberfläche reifer Intermediärzotten angiogenetisch getrieben weitere Terminalzotten und führen zu einer massiven Zunahme der engmaschig mit Kapillaren unterfütterten Zottenoberfläche, die zum Stoffaustausch zur Verfügung steht.

1.2. Aufbau der reifen menschlichen Plazenta und ihre Funktionen

Die reife Plazenta wiegt 400 - 600 g, ist *post-partum* circa 1,5 - 2 cm dick und hat einen mittleren Durchmesser von 15 - 22 cm [Haeussner et al., 2013]. Sie wird auf der kindlichen Seite durch die Chorionplatte und auf der mütterlichen Seite durch die Basalplatte (der an der Plazenta verbliebene Teil der Lösungszone) begrenzt. Das Chorion wird von Amnion (ein Teil der Fruchtblase, bzw. der Eihäute) bedeckt. Arterielle- und venöse Blutgefäße des Chorions, laufen in Richtung Nabelschnur zusammen. Sie konvergieren zu zwei Nabelarterien und einer Nabelvene und ziehen weiter in die Nabelschnur. Die Nabelschnur setzt an der chorialen Seite an. Sie kann zentral, exzentrisch, marginal und in seltenen Fällen an der Chorionmembran außerhalb der Plazenta (*Insertio velamentosa*) inserieren [Sadler, 2008]. An der Basalplatte ist die Plazenta durch Septen in zehn bis vierzig Kompartimente, die Kotyledonen unterteilt. Die Septen reichen nicht bis zur Chorionplatte hin und unterteilen den intervillösen Raum somit nicht vollständig [Benirschke et al., 2012].

An der reifen Chorionplatte sind sechzig bis siebzig Zottenstämme entstanden, welche sich im Verlauf verzweigen und eine Baumstruktur annehmen [Benirschke et al., 2012]. In jedem Kotyledon sind Ausläufer von mindestens einem, meist aber mehreren Zottenbäumen zu finden. Einige erreichen die Basalplatte, sind an ihr fixiert und dienen als Haftzotten der Stabilisierung des komplexen Zottensystems [Kaufmann, 1985b; Benirschke et al., 2012].

Die Zotten der menschlichen Plazenta werden meist anhand ihrer Bindegewebsstruktur eingeteilt [Kaufmann et al., 1979; Sen et al., 1979; Castellucci et al., 1990; Castellucci et al., 2000]. Im ausgereiften Zottenbaum sind die Stammzotten zentral, welche im weiteren Verlauf in reife intermediäre Zotten verästeln und schließlich mit den Terminalzotten enden. Im reifen Zottenbaum finden sich nur noch kleine Bereiche mit mesenchymalen Zotten und unreifen Intermediärzotten, hauptsächlich aber reife Zottentypen. Der Ablauf der Zottenreifung und die Umstellung der Baumstruktur nach der 20. Woche der Schwangerschaft sind in Abbildung 1 dargestellt.

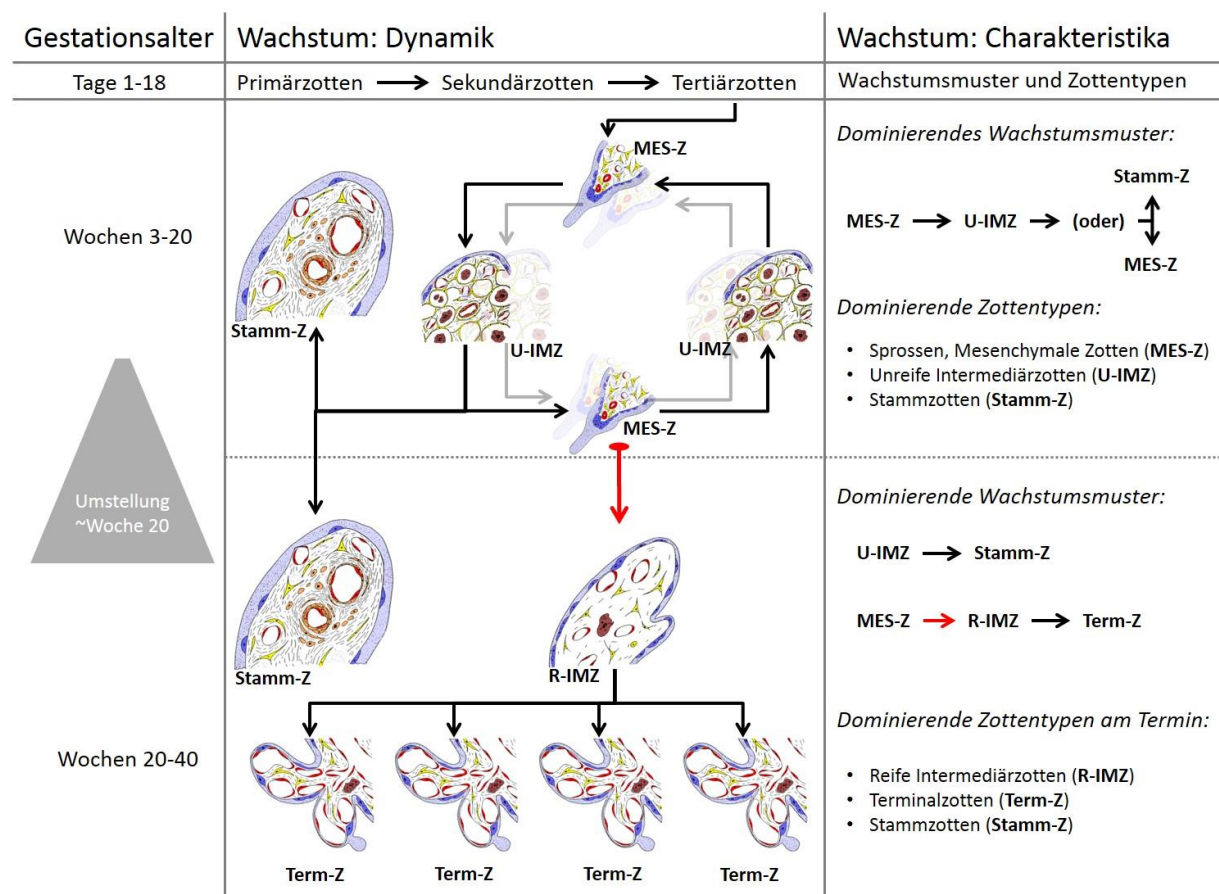


Abbildung 1: Die tabellarisch aufgebaute Abbildung bietet einen Überblick über die Wachstums- und Reifungsvorgänge im Zottenbaum der menschlichen Plazenta. Die linke Spalte gibt die zeitliche Abfolge wieder, wobei die ersten Tage der Schwangerschaft (Tage 1-18) und vom restlichen Zeitraum noch einmal zwei Hauptabschnitte, nämlich die Zeit bis zur und nach der 20. Woche unterschieden werden. Um die 20. Woche ist ein Zeitraum, in dem sich die beiden Phasen der Zottenreifung allmählich ablösen. Nach Bildung der ersten Tertiärzotten folgt das Wachstum einem zyklischen Geschehen, bei dem unreife Intermediärzotten und mesenchymale Zotten auseinander hervorgehen, und gleichzeitig aus gealterten unreifen Intermediärzotten zu Stammzotten werden. Nach der 20. Woche entstehen aus den

mesenchymalen Zotten zunehmend reife Intermediär- und Terminalzotten, die keine weitere zyklische Sprossung ermöglichen. In der rechten Spalte sind wichtige Merkmale des Wachstumsmusters und die Abkürzungen für die Zottentypen zusammengestellt. [modifiziert nach Frank, 2016]

Die Zotten sind vom intervillösen Raum (INTRO) umgeben, in welchem mütterliches Blut zirkuliert. Der Trophoblast als äußerste Schicht grenzt den gesamten Zottenbaum zum INTRO hin ab. In den Zotten verlaufen fetale Gefäße, welche in das Stroma eingebettet sind. Je nach Zottentyp besteht das Stroma aus mesenchymalen Zellen, Fibroblasten und Myofibroblasten [Kohnen et al., 1996], welche grundsätzlich kontraktile sind und durch Bildung kollagener und elastischer Fasern [Graf et al., 1997; Graf et al., 1995b] für die Stabilität der Zottenstruktur verantwortlich sind. Vor allem vor der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) sind des Weiteren viele Makrophagen (Hofbauer Zellen) vorzufinden, welche neben Phagozytose auch sekretorische Funktion besitzen, und durch Wachstumsfaktoren Gefäß- und Zottenwachstum sowie deren Differenzierung stimulieren [Kohnen et al., 1996; Castellucci et al., 1984].

Die Stammzotten enthalten größere, zentrale arterielle und venöse Blutgefäße. Sie weisen in ihrer Gefäßwand eine im Lichtmikroskop erkennbare Tunica media (enthält hauptsächlich glatte Muskelzellen) bzw. Tunica externa (enthält hauptsächlich Kollagen) auf [Benirschke und Kaufmann, 2000]. Die Blutgefäße werden von dichtem Stroma umgeben und gestützt. In direkter Umgebung der Blutgefäße enthält das Stroma reichlich Myofibroblasten, welche parallel zum longitudinalen Zottenverlauf angeordnet sind [Benirschke und Kaufmann, 2000; Kohnen et al., 1995; Graf et al., 1995a; Graf et al., 1994]. Diese Myofibroblasten bilden ein kontraktiles System, welches als perivaskuläre Manschette (PVSM) bezeichnet wird [Graf et al., 1997]. Diese PVSM bildet eine funktionelle myofibroelastische Einheit und ist in dieser Form nur in der Plazenta zu finden [Graf et al., 1997; Graf et al., 1996]. Man nimmt an, dass durch eine longitudinale Kontraktion der Stammzotten das Volumen des INTRO verringert und dadurch dessen Widerstand moduliert werden kann. So kann Einfluss auf den mütterlichen Blutfluss in der Plazenta genommen werden [Benirschke und Kaufmann, 2000; Kohnen et al., 1996], wodurch eine Regulation des Blutflusses im INTRO unabhängig von den physiologischen vasomotorischen Veränderungen der mütterlichen uterinen Blutgefäße möglich zu sein scheint [Moll et al., 1988]. In den Stammzotten der höheren Ordnung sind vollständige, röhrenförmige kontraktile Manschetten um die Media der Gefäße zu finden. Je weiter nach peripher der sich

über mehrere Hierarchiestufen verzweigende Zottenbaum reicht, desto dünner wird die PVSM. In den terminalen Verzweigungen der Stammzotten, die sich im Kaliber nicht mehr von den peripher sich anschließenden Intermediärzotten unterscheiden, besteht nur noch ein loses Netzwerk einzelner kontraktiler Zellen in perivaskulärer Position [Kohnen et al. 1996].

Aus den letzten Verzweigungen der Stammzotten zweigen Intermediärzotten ab, in denen sich im weiteren Verlauf zunehmend fetale Kapillaren verästeln. Kontraktiler Zellen außerhalb der direkten Gefäßwandung sind hier im Stroma nicht mehr zu finden. Zwischen den fetalen Kapillaren sind weitere Arteriolen und Venolen angesiedelt [Kaufmann et al., 1988; Kaufmann et al., 1985a]. Die Gefäße der Intermediärzotten besitzen im Gegensatz zu den Gefäßen der Stammzotten keine im Lichtmikroskop identifizierbare Tunica media bzw. Tunica externa [Benirschke und Kaufmann, 2000]. Sie sind in lockerem Bindegewebe mit vereinzelter Zellen und Fasern eingebettet. Durch den hohen Grad an Gefäßen und der großen Oberfläche der Intermediärzotten nimmt man an, dass Zotten dieses Typs wesentlich am fetomaternalen Stoffaustausch beteiligt sind. Zudem wird vermutet, dass die Intermediärzotten auch an der Hormonproduktion beteiligt sind [Benirschke und Kaufmann, 2000]. Die vorkommenden terminalen Arteriolen sind ein Hinweis darauf, dass sie die Vasoregulation (Regulation des Blutdrucks innerhalb von Gefäßen über Verengung oder Erweiterung des Gefäßes) der Intermediärzotten beeinflussen. In normalen Plazenten beanspruchen die intermediären Zotten geschätzt ca. 25 % des gesamten Zottenvolumens für sich [Benirschke und Kaufmann, 2000].

Ausgehend von den Intermediärzotten verästelt sich der Zottenbaum weiter in Terminalzotten. Die Kapillaren der Terminalzotten formen zahlreiche läppchenförmige Ausbuchtungen, in denen die Kapillaren dilatieren (Sinusoide). Aufgrund der guten Vaskularisation und der geringen Dicke der Blut-Plazenta-Schranke, findet hier wahrscheinlich der Großteil des fetomaternalen Stoffaustausches statt. Ihre Oberfläche wird auf ca. 50 % der gesamten Oberfläche aller Zotten geschätzt. In der normalen Plazenta nehmen die Terminalzotten 40 % des gesamten Zottenvolumens ein [Benirschke und Kaufmann, 2000; Kaufmann et al., 1988; Kaufmann et al., 1985b].

Der Stoffaustausch zwischen mütterlichem und kindlichem Blut erfolgt über den Trophoblast und über das kontinuierliche Endothel der Kapillaren. Durch die passive

Filterfunktion wird der Durchtritt auf Moleküle mit einer Größe von unter 20 kDa beschränkt [Benirschke et al., 2006; Sibley et al., 1983; Sibley et al., 1982]. Der Trophoblast wird in den Zytotrophoblasten und den Synzytiotrophoblasten unterteilt [Frank, 2011]. Die Zytotrophoblasten fungieren als trophoblastäre Stammzellpopulation, sie proliferieren, differenzieren sich und fusionieren anschließend mit dem Synzytiotrophoblasten [Mayhew, 2001; Huppertz et al., 1998]. So wird der Synzytiotrophoblast mit frischen Zellorganellen und Enzymen versorgt. Alternde Bestandteile des Synzytiotrophoblasten gehen in die Apoptose (programmierter Zelltod) über und werden durch Abschnürungsvorgänge in den mütterlichen Blutkreislauf abgegeben. Die abgestorbenen Zellen durchwandern den mütterlichen Kreislauf, gelangen in die Lunge und werden dort abgebaut [Nelson, 1996].

Der Synzytiotrophoblast ist eine zusammenhängende, in der Regel ununterbrochene Schicht, welche die gesamte Zottenoberfläche bedeckt. Ausgenommen sind nur Bereiche, die von Fibrinoid bedeckt sind. Der reguläre Stoffaustausch erfolgt zwischen Mutter und Kind unter der Kontrolle des Trophoblasten über die fetoplazentare Schranke. Dabei handelt es sich hauptsächlich um den Austausch von Stoffwechselprodukten und Gasen. Gase wie Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid können die uteroplazentare Schranke durch Diffusion passieren. Viele Proteine wie z.B. Immunglobuline des Isotyp G werden aktiv über die fetoplazentare Schranke transportiert. Weitere funktionelle Eigenschaften des Synzytiotrophoblasten sind die Sekretion von plazentaren Hormonen (z.B. Progesteron, hCG) sowie eine Beteiligung am Stereoidhormonmetabolismus [Benirschke et al., 2006].

1.3. Wege zur quantitativen Analyse des Zottenbaums der menschlichen Plazenta

Aus den obigen Ausführungen wird deutlich, dass der Zottenbaum der menschlichen Plazenta die wesentliche Struktur der funktionellen Austauschzone dieses Organs ist. Zum Einen finden sich in seinem Inneren die kindlichen Gefäße, über die der wachsende Embryo/Fetus versorgt wird. Zum Anderen ist seine Oberfläche – der Trophoblast – das epitheliale Gewebe, das die aktiven und passiven

Austauschvorgänge mit dem mütterlichen Blut steuert. Die gesamte Struktur des Zottenbaumes ist dabei als dreidimensionales Gebilde zu verstehen.

Der Zottenbaum ist eine Struktur im mikroskopischen Größenbereich, der durch histologische Analyse zugänglich ist. Dies ist auf qualitativer Basis immer wieder unternommen worden (für eine Übersicht, siehe [Benirschke et al., 2012]). Die histologische Untersuchung arbeitet jedoch an zweidimensionalen Schnitten, die nur einen indirekten Zugang zur – eigentlich dreidimensionalen – Baumstruktur ermöglicht.

Die Herausforderung ist also dadurch gegeben, dass aus den üblichen zweidimensionalen histologischen Schnitten dreidimensionale Aussagen über den Zottenbaum gewonnen werden müssen. Diese sollten auch noch quantitativ sein, denn eine wesentliche Herausforderung im Schwangerschaftsverlauf sind diskrete Veränderungen, die noch nicht zu einem fatalen Schwangerschaftsverlauf führen, aber möglicherweise bereits Veränderungen – z.B. bei der Entwicklung des Gehirns – nach sich ziehen können [Schmitz und Frank, 2002].

Eine Methode, die sich dafür anbietet, ist die Stereologie [Howard und Reed, 2010]. Diese Methode ist speziell darauf ausgerichtet, quantitative Aussagen über dreidimensionale Strukturen auf Basis zweidimensionaler Schnitte zu ermöglichen. Sie wurde bereits mehrfach an der Plazenta angewandt (siehe z.B. [Mayhew und Burton, 1997; Mayhew, 2006]). In den meisten Fällen wurde dabei der Zottenbaum nicht weiter untergliedert, sondern alle Zottenabschnitte gleich behandelt. Die seit den achtziger Jahren verbreitet genutzte Unterteilung in Terminal-, Intermediär-, und Stammzotten ist für viele Zottenabschnitte nicht eindeutig zu treffen, weil zum Beispiel sinusoidale Kapillaren sowohl in Intermediärzotten als auch in Terminalzotten vorkommen können [Haeussner et al., 2015; Kaufmann et al., 1979]. Eine jüngst publizierte Studie zu dem Problem dreidimensionaler Analysen aus histologischen Schnitten der Plazenta wies die substanziellen Schwächen dieser Herangehensweise nach, insbesondere die starke subjektive Abhängigkeit vom Untersucher wie auch die erhebliche Streuung [Haeussner et al., 2015; Haeussner et al., 2014¹].

Eine Alternative zu den vom Untersucher abhängigen subjektiven histologischen Zuordnungen von Zotten können Antigene sein, die die Reifung des Stromas der

¹ Dieser Artikel entstand zum Teil aus den Daten dieser Doktorarbeit. Die Autorin dieser Promotionsarbeit war in diesem Artikel als Zweitautor tätig.

Stammzotten markieren und damit zumindest die Stammzotten bis hinein in die kleinkalibrigen Ausläufer der Stammzotten von anderen Zottentypen Untersucherunabhängig unterscheidbar machen können. Ein wichtiger und für die Myofibroblasten im Stroma der Stammzotten typischer Marker ist das „ γ -smooth-muscle“-Aktin (γ -sm-Aktin), ein Zytoskelettprotein, das nur in der perivaskulären Zone kleiner und großer Stammzotten exprimiert wird [Demir et al., 1997; Kohnen et al., 1996]. Auch fehlen bisher systematische und ausreichend weit gefächerte Untersuchungen zu den Normwerten wichtiger stereologischer Parameter in möglichst objektiv unterscheidbaren Unterabschnitten von Zottenbäumen der menschlichen Plazenta und zu ihrer intra- und interplazentaren Variabilität.

2. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel:

1. Den Zottenbaum der menschlichen Plazenta mit einer immunhistochemischen Methode, d.h. ohne subjektive Untersucher-Interpretation, zu typisieren. Der immunhistochemische Nachweis des Markers γ -sm-Aktin in den perivaskulären Myofibroblasten wird zur Differenzierung zentraler und peripherer Anteile des Zottenbaums verwendet.
2. Die absoluten und relativen Partialvolumina der immunhistochemisch differenzierten Unterabschnitte des Zottenbaums der menschlichen Plazenta mit Hilfe stereologischer Methoden zu bestimmen.
3. Aus diesem Vorgehen Normwerte zu ermitteln und auf dem Wege der Power-Berechnung eine Abschätzung der Sensitivität der hier etablierten Vorgehensweise zu liefern. Diese Daten können auch als Grundlage zur Fallzahlabeschätzung zukünftiger Studien dienen.

3. Material und Methoden

3.1. Studienmaterial

Als Studienmaterial wurden 50 Plazenten aus klinisch unauffällig verlaufenden Schwangerschaften analysiert. Die Plazenten wurden von 04.04.2011 bis 12.09.2011 in Kooperation mit der geburtshilflichen Abteilung des Klinikums Dritter Orden (München, Deutschland, Kooperationspartner Hr. Dr. Edler von Koch) gesammelt. Folgende Einschlusskriterien wurden dabei berücksichtigt:

- Der Verlauf der Schwangerschaft und der Geburt war klinisch unauffällig (laut geburtsbegleitendem Arzt)
- Es war keine Untersuchung der Plazenta auf Pathologien nötig (laut geburtsbegleitendem Arzt)
- Einer ausdrücklichen Erlaubnis der zuvor aufgeklärten Eltern die Plazenten für Forschungszwecke zu verwenden lag vor (die sprachlichen sowie psychischen Voraussetzungen der Eltern, eine eigenständige Entscheidung zu treffen, mussten für die Annahme der Erlaubnis vorliegen)

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians Universität unter der Nummer 084-11 genehmigt.

Die Plazenten wurden direkt nach der Geburt mit einer Nummer versehen, in Plastiktüten verpackt und im Klinikum bei 4 °C - 8 °C aufbewahrt. Einmal täglich, wurden die Plazenten unter konstanter Kühlung in die Anatomische Anstalt der LMU (München, Deutschland) gebracht. Zu jeder Plazenta wurden das Geburtsgewicht des Kindes (GG), das Gestationsalter (GA), der Entbindungsmodus (EM) wie Vaginal- (vaginal) oder Kaiserschnittgeburt (sectio), sowie Geschlecht des Kindes (GENDER) anonymisiert an die Anatomische Anstalt der LMU übermittelt. Dort wurden die Plazenten vermessen (siehe Kapitel 3.2) und für die weiteren histologischen Untersuchungen vorbereitet. Mit Hilfe des Geburts- und Ankunftszeitpunktes in der Anatomischen Anstalt konnte die Verzögerung bis zur Verarbeitung der Plazenten

berechnet werden, um mögliche Artefakte durch lange Lagerzeiten in der histologischen Untersuchung beurteilen zu können.

3.2. Makroskopische Datenerhebung

Nach Entfernung der Nabelschnur (ca. 1 cm über der Chorionplatte) wurden die Plazenten ohne das Chorion laeve zu entfernen gewogen und somit das Plazentagewicht (PG) bestimmt. Mit Hilfe von PG und GG konnte das Verhältnis PG/GG (PG_GG_Ratio) berechnet werden (siehe Formel 1) [Boyd und Hamilton, 1970].

$$\text{PG_GG_Ratio} = \text{PG} / \text{GG} \quad (\text{Formel 1})$$

PG_GG_Ratio: Verhältnis von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht des Kindes (Maß für die Effizienz der Plazenta pro Kindsgewicht)

PG: Plazentagewicht

GG: Geburtsgewicht des Kindes

Die Dicke (DICKE) der Plazenten wurde per Ultraschall (Convex ScannerHS 300, Honda Electronics, Tokyo, Japan) in der Nähe der Nabelschnur ohne Druck ermittelt, wobei die Plazenten immer mit der Seite des Chorions nach oben auf einem Tablett lagen. Mit einem handelsüblichen Lineal wurde der längste- (LDM) und kürzeste (KDM) Durchmesser durch die Nabelschnurinsertion bestimmt. Mit diesen beiden Durchmessern wurde die Oberfläche (OF) der Plazenten nach Formel 2 berechnet [Barker et al., 2011].

$$\text{OF} = \frac{1}{4} \times \pi \times \text{LDM} \times \text{KDM} \quad (\text{Formel 2})$$

OF: Oberfläche

LDM: längster Durchmesser der Plazenta

KDM: kürzester Durchmesser der Plazenta

3.3. Gewebeentnahme durch „systematic random sampling“

Die Verfahren des „systematic random sampling“ stellen eine zufällige Probenentnahme sicher, bei der eine repräsentative Teilmenge der Grundgesamtheit erhalten werden kann. Grundlagen des „systematic random sampling“ von Gewebeproben aus humanen Plazenten wurden bereits von Mayhew [2006] beschrieben. Das Prinzip des in der vorliegenden Arbeit angewandten und an diese Publikation [Mayhew, 2006] angelehnten Verfahrens ist in Abbildung 2 gezeigt. Dabei wird zunächst ein regelmäßiges Raster zufällig auf die Chorionseite der Plazenta projiziert (siehe Schritt 1 in Abbildung 2). Anhand dieses projizierten Punkterasters erfolgt die Entnahme von Gewebeblocks (siehe Schritt 2 in Abbildung 2). Aus diesen Gewebeblocks werden histologische Präparate gefertigt, welche zur stereologischen Untersuchung dienen (siehe Schritt 3 in Abbildung 2).

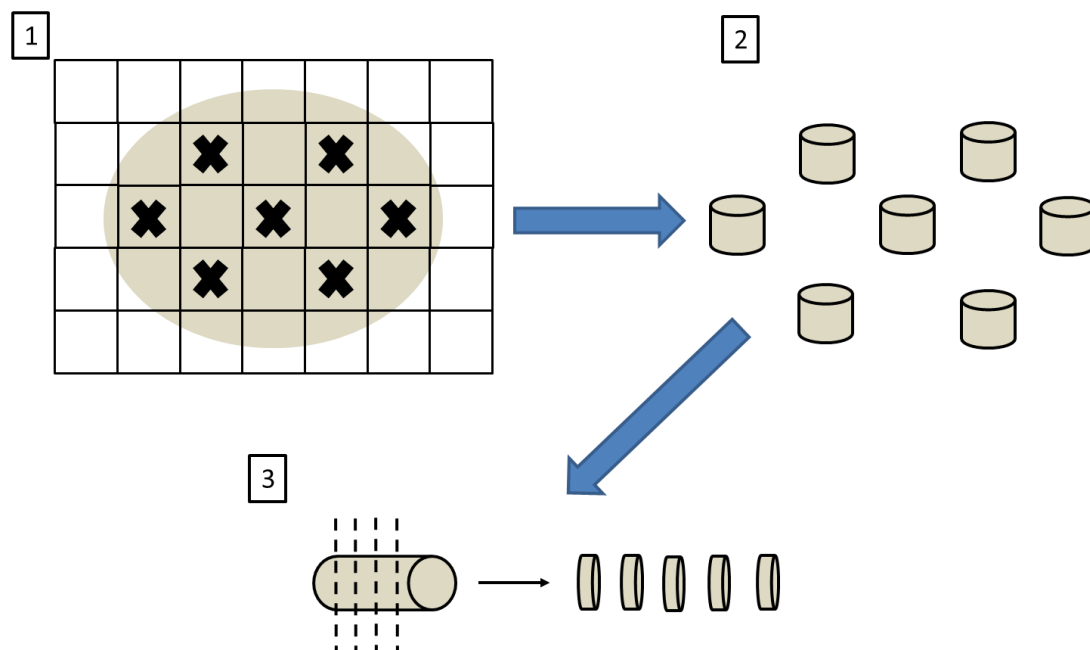


Abbildung 2: Schematischer Ablauf eines „systematic random sampling“ von Plazentaprobe zur stereologischen Untersuchung. Dabei wird zunächst ein regelmäßiges Raster auf die Plazenta projiziert (Schritt 1) und in definierten Abständen (hier jedes zweite Viereck) Gewebeblocks entnommen (Schritt 2). Anschließend erfolgt die Fertigung von histologischen Schnitten aus den ausgewählten Gewebeblocks und die stereologische Untersuchung (Schritt 3). [modifiziert nach Mayhew, 2006]

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Projektor Mini-LED LB 936 (SceneLights Technologie, Buggingen, Deutschland) ein vordefiniertes Punkteraster auf die kindliche (choriale) Seite der Plazenta projiziert (siehe Abbildung 3). Die Markierung der Entnahmeorte erfolgte nach folgendem Schema:

- Der erste vollständig auf der Plazenta liegende Projektionspunkt wurde mit einem Pin markiert.
- Jeder darauffolgende dritte Projektionspunkt (bei großen Plazenten jeder vierte) wurde ebenfalls mit einem Pin markiert.
- Der Ansatz der Nabelschnur wurde mit einem zusätzlichen Pin hervorgehoben.

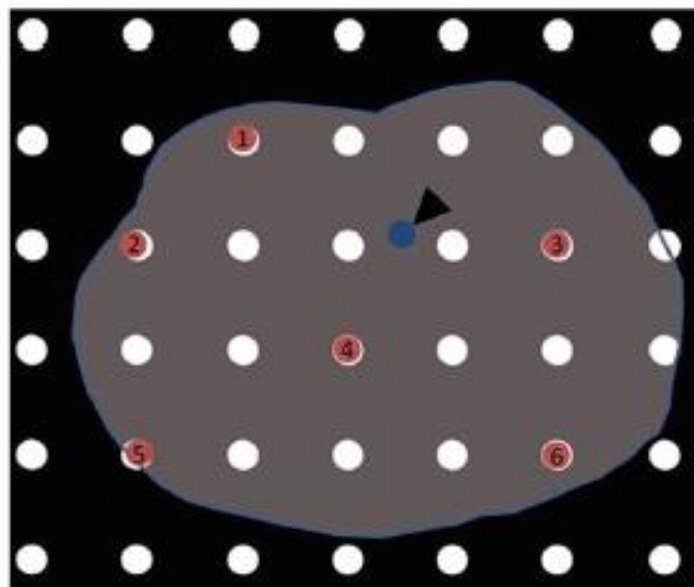


Abbildung 3: Schematische Darstellung des projizierten Punkterasters auf einer Plazenta zur randomisierten Gewebeentnahme. Der blaue Pin markiert die Lage der Nabelschnur. Die nummerierten roten Punkte markieren die Entnahmeorte [aus Haeussner et al., 2013].

Die mit Pins markierte Plazenta wurde zusammen mit einem Lineal (Standardlineal, 30 cm) fotografiert (Power Shot G12, Canon, Krefeld, Deutschland), um nachträglich den Abstand zur Nabelschnurinsertion (dist. zu NS) und den Abstand zum äußeren Rand der Plazenta (dist. zu RD) der einzelnen Gewebeproben zu bestimmen. Dies wurden mit Hilfe des Programms Stereo Investigator Version 11.02 (offline; MBF Bioscience, Williston, VT, USA) nach Kalibrierung mit Hilfe des mitfotografierten Lineals berechnet (siehe Abbildung 4).

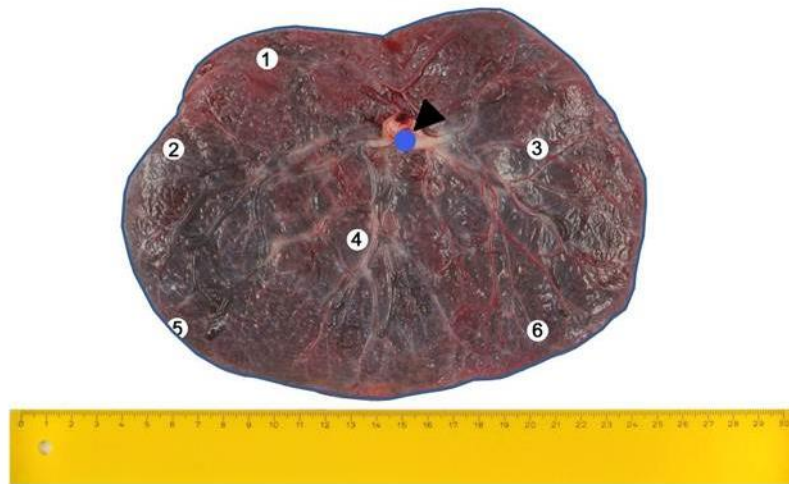


Abbildung 4: Foto einer Plazenta mit den zugehörigen Probeentnahmepunkten 1 - 6. Die Nabelschnurinsertion ist mit einem blauen Punkt markiert. Das Lineal dient zur Längenkalibrierung (aus [Haeussner et al., 2013])

Dazu wurden die Fotos in das Programm „Stereo Investigator“ importiert. Das mitfotografierte Lineal wurde genutzt, um ein von der Software virtuell über das Foto gelegtes Koordinatensystem zu kalibrieren. Über die kartesischen Koordinaten der Pins konnten die Abstände der Gewebeproben zur Nabelschnurinsertion berechnet werden (siehe Formel 3). Der Abstand zum äußeren Rand der Plazenta wurde anhand der Koordinaten der Pins und der Funktion „Nearest Neighbor“ des Programms im Offline-Modus bestimmt [Haeussner et al., 2013].

$$\text{Dist zu NS} = \sqrt{[(X_{\text{Pin}} - X_{\text{NS}})^2 + (Y_{\text{Pin}} - Y_{\text{NS}})^2]} \quad (\text{Formel 3})$$

Dist zu NS: Distanz zur Nabelschnurinsertion

X_{Pin} : X-Koordinate des Pins

X_{NS} : X-Koordinate der Nabelschnurinsertion

Y_{Pin} : Y-Koordinate des Pins

Y_{NS} : Y-Koordinate der Nabelschnurinsertion

An den sechs mit Pins markierten Stellen wurden mit einer Schere Gewebelöcher aus der Plazenta entnommen. Die entnommenen Gewebelöcher hatten eine Kantenlänge von 0,5 cm – 1 cm. Es wurde bei jedem entnommenen Gewebelöcher darauf geachtet, dass an der betreffenden Stelle alle sichtbaren Gewebeschichten der Plazenta von der Basal- bis zur Chorionplatte in die entnommene Probe einbezogen wurden. Die entnommenen Gewebeproben wurden zunächst für mindestens 24 Stunden bei 4°C in 4 %igem Formalin (phosphatgepuffert, pH 7.2; RotiHistofix, #5666.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Nach der Fixierung wurde das Formalin mit Leitungswasser für 5 bis 6 Stunden ausgewaschen. Anschließend erfolgte die

Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (vergällt; 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %; je 5 min). Über das Intermedium Xylol (#108681, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Proben in Paraffin (Paraplast Plus, # 76258, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) eingebettet (Standardverfahren nach Mulisch und Welsch [2010]). Von den eingebetteten Plazentablöcken wurden mittels des Paraffin-Schlittenmikrotoms (SM2000R; Leica, Wetzlar, Deutschland) 4 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und luftgetrocknet.

3.4. Immunhistochemie und Färben der Gewebeschnitte

Gefäße des gesamten Stammzottenbaumes werden – perivaskulär, d.h. außerhalb der Media der Gefäße – von einer parallel zu den Gefäßen orientierten PVSM umgeben, die selbst bei den kleinsten Stammzotten immer noch aus einzelnen, perivaskulär liegenden Zellen besteht. Periphere Zottentypen (Intermediär- oder Terminalzotten) weisen Kapillaren oder Sinusoide, aber keine Gefäße mit einer PVSM auf. Um Zotten mit PVSM verschiedenen Kalibers von den übrigen Zottentypen sicher und standardisiert unterscheiden zu können, wurden spezifische Zytoskelett-Marker der Zellen der kontraktile Manschette immunhistochemisch markiert. Diese Methode nutzt die bekannte Tatsache, dass die PVSM über Antikörper gegen γ -sm-Aktin immunhistochemisch angefärbt werden kann [Demir et al., 1997]. Über eine genau definierte Antikörperkonzentration während der Färbung gelingt es, die PVSM ohne Nebenreaktionen in anderen Geweben spezifisch anzufärben und dadurch eine sichere und standardisierte Abgrenzung von Stammzotten zu anderen Zottentypen zu realisieren.

Die auf dem Objektträger aufgebrachten und getrockneten Gewebeschnitte wurden vor der Färbung über Xylol und eine absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert.

Nach Entparaffinierung erfolgte die immunhistochemische Doppel-Färbung, bei der das gesamte Kapillarendothel über einen Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD34 sowie das γ -sm-Aktin der perivaskulären kontraktile Zellen spezifisch angefärbt wurden. Zellkerne wurden abschließend durch eine Hämalaun-Gegenfärbung nach Mayer dargestellt (Standardverfahren nach Mulisch und Welsch [2010]). Für alle

Verdünnungen und Lösungen wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4 / PBS) verwendet. Die Herstellung der verwendeten 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal, Life Technologies, #B1690, Darmstadt, Deutschland) Stammlösung und des verwendeten X-Gal Puffers wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte der Färbung des Kapillarendothels und des γ -sm-Aktins sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 wiedergegeben. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die folgende Häkalaunfärbung nach Mayer wurde nach den Protokollen in Mulisch und Welsch [2010] durchgeführt. Gebläut wurde durch Spülen in Leitungswasser. Die Abfolge der hier berichteten Schritte hatte sich aus empirischen Optimierungen als die am geeignetste Vorgehensweise ergeben.

Abschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte in Kaisers Glyceringelatine (Merck, #109242, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurden die eingedeckten Gewebeschnitte mit handelsüblichem Nagellack umrandet und im Kühlschrank bei 2°C bis 8°C bis zur stereologischen Untersuchung gelagert.

Tabelle 1: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung des Kapillarendothels.

#	Beschreibung	Verwendete Lösung	Dauer
1	Entparaffinieren	Schritt 1: Xylol	2 x 10 min
		Schritt 2: Ethanol-Reihe bis Aqua dest.	Je 2 min
2	Spülen	PBS	5 min
3	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität im Gewebe mit 3 % Wasserstoffperoxid	180 ml PBS + 20 ml H ₂ O ₂ (Merck, #107209, Darmstadt, Deutschland)	30 min
4	Spülen	PBS	5 min
3	Blockierung in 5 % Ziegen-0-Serum in PBS	950 μ l PBS + 50 μ l Ziegen-0-Serum (Vector Labs, #S100, Burlingame, CA, USA)	30 min
5	Inkubation mit primärem Antikörper anti-CD34 Endverdünnung 1:900	1:900 Verdünnung: 899 μ l 5 % Ziegen-0-Serum in PBS (analog Schritt 3) + 1 μ l anti-CD34 (Thermo Fisher	45 min

#	Beschreibung	Verwendete Lösung	Dauer
		Scientific, #MS-363-PO, Fremont, CA, USA)	
6	Spülen	PBS	3 x 5 min
7	Inkubation mit sekundärem biotinyliertem Ziegen-anti-Maus-IgM-Antikörper Endverdünnung 1:200	Lsg. A: 0,02 g bovines Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, #A7030, München, Deutschland) in 1 ml PBS. Lsg. B: 995 µl Lsg. A + 5 µl sekundärer Antikörper (Vector Labs, #BA9200, Burlingame, CA USA)	45 min mit Lsg. B
8	Spülen	PBS	3 x 5 min
9	Inkubation mit Vectastain-ABC-Peroxidase-Standard-Kit (Vector Labs, #PK4000, Burlingame, CA, USA)	1 ml PBS + 10 µl Lsg. A (aus Kit) + 10 µl Lsg. B (aus Kit)	45 min
10	Spülen	PBS	3 x 5 min
11	Visualisierung mit Diaminobenzidin (DAB), als Substrat	1 ml DAB (Sigma-Aldrich, #D12348, München, Deutschland) (0,67 mg/ml) + 2 µl H ₂ O ₂	20 min
12	Stoppen	Leitungswasser	Kurz
13	Spülen	PBS	2 x 5 min
14	Lagern	PBS bei 4°C	über Nacht

Tabelle 2: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung der perivaskulären Manschette über γ -sm-Aktin.

#	Beschreibung	Verwendete Lösung	Dauer
1	Spülen	PBS	5 min
2	Blockierung mit 5% Ziegen-O-Serum	950 µl PBS + 50 µl Ziegen-O-Serum	30 min
3	Inkubation mit primärem Antikörper γ -sm-Aktin Endverdünnung 1:900	1 µl γ -sm-Aktin AK (MP Biomedicals, #69133 Eschwege, Deutschland) + 899 µl 1% BSA in PBS pH 7.6	120 min

#	Beschreibung	Verwendete Lösung	Dauer
4	Spülen	PBS	3 x 5 min
5	Inkubation mit sekundärem biotinyliertem Ziegen-anti-Maus-IgM-Antikörper Endverdünnung 1:200	995 µl 5% Ziegen-0-Serum in PBS (siehe Schritt 2) + 5 µl AK	45 min
6	Spülen	PBS	3 x 5 min
7	Inkubation Streptavidin-β-Galactosidase-Konjugat Endverdünnung 1:100	990 µl PBS + 10 µl Streptavidin-β-Galactosidase-Konjugat (Life Technologies, #S931, Darmstadt, Deutschland)	40 min
8	Spülen	PBS	mindestens 30 min
9	Nachweis der Galactosidase mit X-Gal als Substrat Endverdünnung 1:40	975 µl X-Gal Puffer (auf 37°C vorwärmen) + 25 µl X-Gal Stammlösung	25 min
10	Spülen	PBS	3 x 5 min
11	Spülen	Aqua dest.	kurz
12	Gegenfärbung	Hämalaun	5 sek
13	Bläuen	Leitungswasser	5 min
14	Spülen	Aqua dest.	Kurz
15	Eindecken	Kaisers Glyceringelatine	

3.5. Volumenbestimmung durch „unbiased Stereology“

Die Bestimmung von Volumenanteilen festgelegter Strukturen über das „point counting“ ist ein weit verbreitetes Verfahren in biomedizinischen Anwendungen und wird auch als Cavallieri-Prinzip bezeichnet [Howard und Reed, 2010]. Das Verfahren des „point counting“ zur Implementierung dieses Prinzips geht auf Thompson [1930] zurück, welcher folgende Aussage bestätigen konnte:

„Wird ein regelmäßiges Punkteraster über ein Präparat gelegt, so ist der Volumenanteil einer bestimmten Struktur proportional zu dem Anteil an Punkten des Punkterasters, die diese Struktur treffen.“

Die stereologischen Messungen wurden an den Stereologie-Arbeitsstationen, welche aus rechnergesteuerten Hochleistungs-Forschungsmikroskopen bestehen, durchgeführt. Von Bedeutung ist, dass diese Mikroskope den Objekttisch mit hoher Genauigkeit in x und y Richtung unter dem Objektiv bewegen können. Diese Vorgänge sind mit dem Rechner und der dort installierten Stereologie-Software kalibriert. Die Software (Stereo Investigator Software Version 11.02) ist technisch dazu imstande, jeden beliebigen Punkt im Schnitt genau anzufahren. Das mikroskopische Bild wird von einer Kamera simultan auf den Monitor des kontrollierenden Rechnersystems gebracht, wo es mit Messgittern und Messpunkten gemäß den Vorgaben der Software überlagert wird.

Zur Durchführung der Messung wurde zunächst am Rechnerbild die „Region of Interest“ (ROI, der gesamte Plazenta-Schnitt) durch eine Kontur umschlossen. Innerhalb der ROI platziert das Programm systematisch zufällig (systematically random) ein Punktraster. Mit Hilfe der Analyseoption „Optical Fractionator Workflow“ des Programms Stereo Investigator Version 11.02 wurden die Schnitte anhand eines festgelegten Zählrahmens in etwa 300 Messpunkte aufgeteilt. Der Zählrahmen an jedem der 300 Punkte war horizontal 50 μm und vertikal 100 μm groß. Bei hoher Vergrößerung fährt das Mikroskop dann – gesteuert von der Software – jeden einzelnen Messpunkt nacheinander an und ermöglicht die Erfassung der Daten.

An jedem Punkt des Rasters kann der jeweilige Ort einer bestimmten Substruktur zugeordnet werden; diese Zuordnungen werden in der Software als sogenannte „Marker“ mit einer bestimmten Bedeutung hinterlegt. Die von der Software anschließend ausgegebenen Datenfiles berücksichtigen diese Namensgebung automatisch.

Der Anteil der Punkte, die eine bestimmte Struktur treffen, an der Gesamtheit der Punkte des Punkterasters ist proportional zu dem relativen Volumenanteil der entsprechenden Struktur an der Gesamtplazenta. Über das Referenzvolumen (in diesem Fall das Plazentavolumen abgeleitet aus PG) kann das absolute Volumen der jeweiligen Struktur berechnet werden [Howard und Reed, 2010].

Es wurden folgende unterschiedliche mikroskopische Arbeitsplätze verwendet:

- 1) Lichtmikroskop Axioskop mit feinkalibrierbarem Revolver (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), Objektive (1,25x / 0,035; 40x / 0,75) (Carl Zeiss, Jena,

Deutschland), Steuereinheit LEP MAC 6000 XYZ (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY USA), Messtaster MT 1271 (Dr. Johannes Heidenhain, Traunreut, Deutschland) und Kamera CCD-Color (3/4" CCD chip, 1,92 MP, 1600x1200 Pixel, MBF Bioscience, Williston, VT, USA)

- 2) Lichtmikroskop BX50 (Olympus, Tokyo, Japan) mit motorisiertem XYZ Probenhalter (MBF Bioscience, Williston, VT, USA), Objektive (1,25x / 0,035; 40x / 0,75) (Olympus, Tokyo, Japan), Steuereinheit LEP MAC 6000 XYZ, Messtaster MT 1271 und Digitalkamera (1/2" CCD Chip, 1392x1040 Pixel, MBF Bioscience, Williston, VT, USA)

Die Rechner zur Steuerung der Mikroskope waren unter MS Windows 7 konfiguriert und nutzten die Software Stereo Investigator Version 11.02. Pro entnommenem Gewebestück wurde ein Schnitt stereologisch analysiert (50 Präparate mit je 6 Schnitten; d.h. es wurden 300 stereologische Messvorgänge durchgeführt).

Die Marker, die an einzelnen Messpunkten vergeben wurden, waren folgenden Substrukturen des Zottenbaumes zugeordnet:

- Nicht immunhistochemisch unterteilte Volumina:
 - Intervillärer Raum (INTRO)
 - Fibrinoid (an Zottenoberflächen; FIB)
 - Gesamtvolumen des Zottenbaumes (SUZO), als Addition der Teilvolumina SUposZO und SUNegZO (s.u.)
 - Ohne Zuordnung zum Zottenbaum, z.B. Chorionplatte, Basalplatte (UNDEF)
- Volumen γ -sm-Aktin positiver Zottenstrukturen (SUposZO) als Summe der Teilvolumina:
 - Synzytiotrophoblast Aktin positiver Zotten (posSYN)
 - Stroma Aktin positiver Zotten (posSTRO)
 - Gefäßendothel Aktin positiver Zotten (posENDO)
 - Gefäßlumen Aktin positiver Zotten (posLUM)

- Volumen γ -sm-Aktin negativer Zottenstrukturen (SUnegZO) als Summe der Teilvolumina:
 - Synzytiotrophoblast Aktin negativer Zotten (negSYN)
 - Stroma Aktin negativer Zotten (negSTRO)
 - Gefäßendothel Aktin negativer Zotten (negENDO)
 - Gefäßlumen Aktin negativer Zotten (negLUM)

Die Summenparameter SUZO (Summe aller Parameter außer INTRO, FIB und UNDEF), SUposZO und SUnegZO wurden nicht direkt stereologisch bestimmt, sondern als Summe der pro Plazenta erhobenen Mittelwerte der jeweiligen Teilvolumina errechnet.

Abbildung 5 und Abbildung 6 zeigen das charakteristische Erscheinungsbild der einzelnen mikroskopisch bestimmten Strukturen.

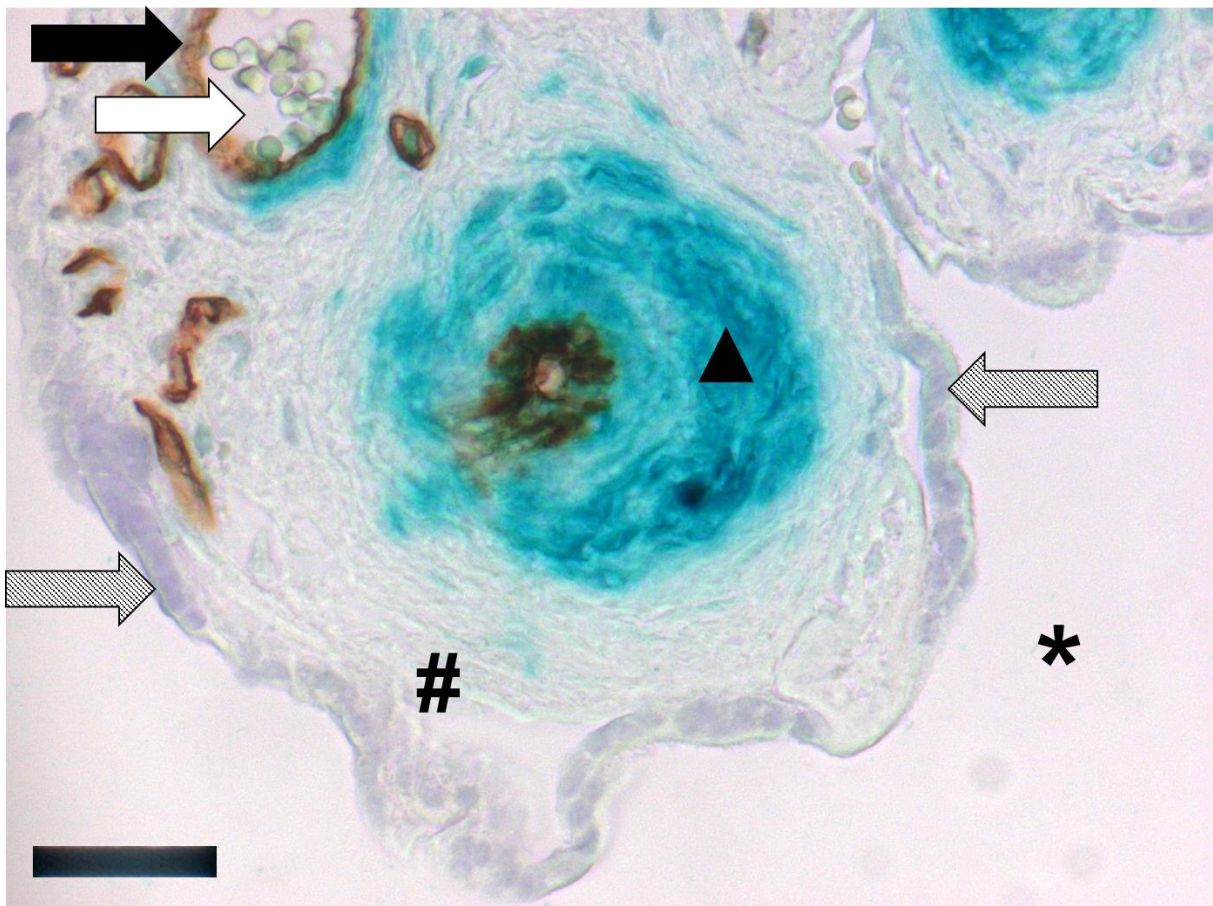


Abbildung 5: Das Foto zeigt eine Aktin positive Zotte der Plazenta in 40facher mikroskopischer Vergrößerung (40x). In der Zotte verlaufen Gefäße, welche von einer perivaskulären Manschette

(indigo-blau gefärbt, schwarzes Dreieck) umgeben sind. Zu sehen sind Gefäßlumen (weißer Pfeil) und Gefäßendothel (braun gefärbt; schwarzer Pfeil). Randständig verlaufen mehrere kleinere Gefäße. Die Gefäße sind in Stroma (Raute) eingebettet. Die Zotte wird in Richtung intervillösen Raum (Stern) von einer dünnen Schicht Synzytiotrophoblast (blau; schwarz schraffierter Pfeil) abgegrenzt. Der Messbalken entspricht 25µm.

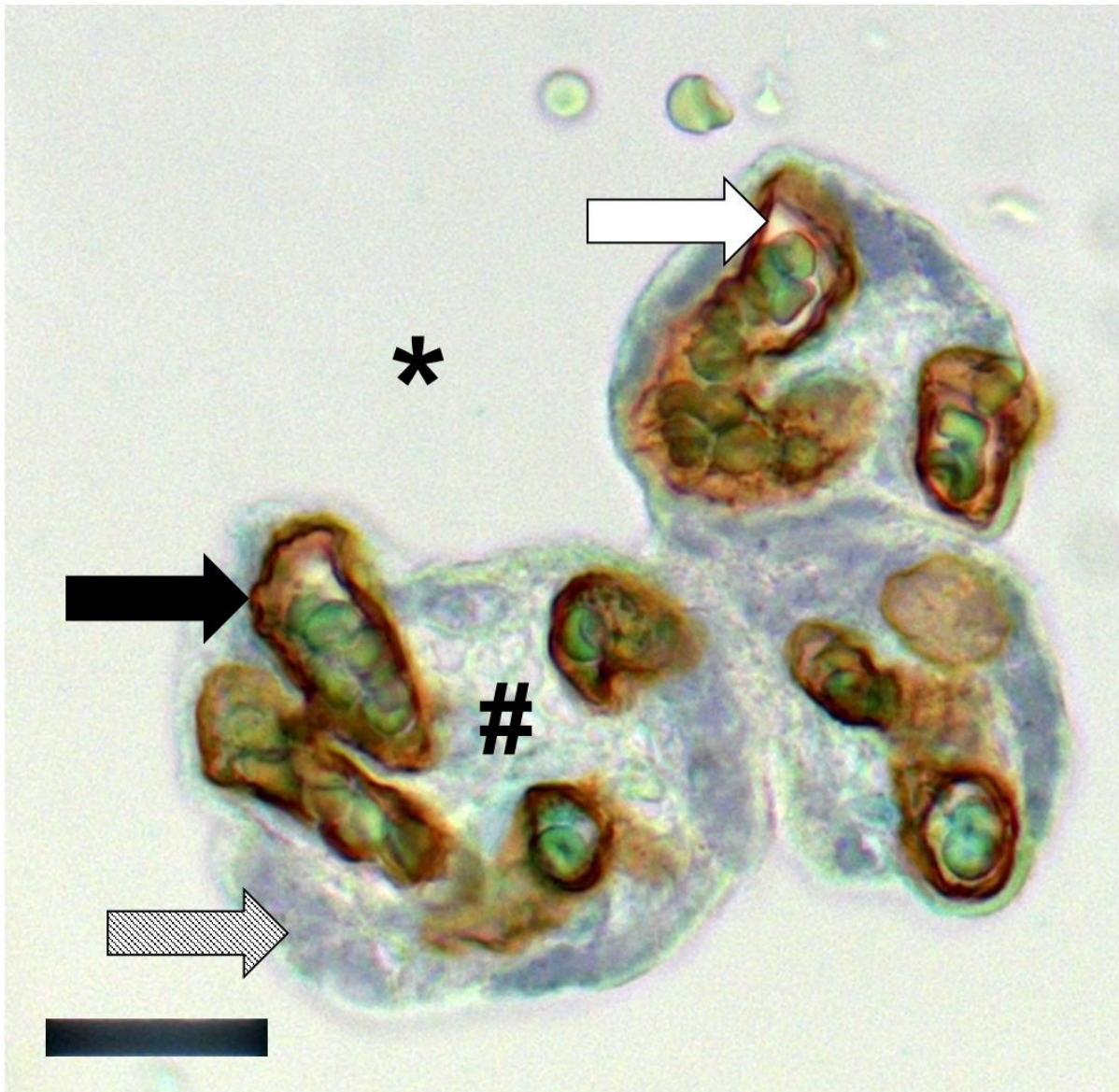


Abbildung 6: Das Foto zeigt eine Aktin negative Zotte in 40facher mikroskopischer Vergrößerung (40x). Die Gefäße befinden sich insgesamt nah an der Zottenoberfläche. Das Gefäßlumen (Weißer Pfeil) wird vom Gefäßendothel (Schwarzer Pfeil) in Richtung Stroma (Raute) begrenzt. Die Zotte wird von einer dünnen Schicht Synzytiotrophoblast (schwarz schraffierter Pfeil) vom intervillösen Raum (Stern) abgegrenzt. Es ist keine perivaskuläre Manschette zu sehen. Der Messbalken entspricht 25 µm.

Nach Beendigung der Messung wurden die Rohdaten ("Counts" der einzelnen Marker) zur weiteren Auswertung in Excel-Tabellen übertragen.

3.6. Statistische Analyse

Aus den Rohdaten der stereologischen Untersuchung wurde zunächst über Formel 4 das absolute Volumen des entsprechenden Markers pro Schnitt berechnet. Dabei wurde eine Dichte der Plazenta von 1 g/ml angenommen [del Nero et al., 2002].

$$MV = (CM/CG \times PG \times 100) / \rho(P) \quad (\text{Formel 4})$$

MV = Volumen des Markers [ml]

CM = „Counts“ des Markes

CG = Gesamtanzahl „Counts“ des Schnitts

PG = Plazentagewicht [g]

$\rho(P)$ = Dichte der Plazenta [g/ml]; hier als 1 g/ml gesetzt

Für Vergleiche mikroskopischer Parameter untereinander und für Vergleiche von mikroskopischen mit makroskopischen Parametern, wurden für die einzelnen Marker die Mittelwerte aus den Volumina der sechs Schnitte einer Plazenta gebildet. Aufgrund der Annahme nicht-normalverteilter Daten [Gill et al., 2014] wurde mit diesen Mittelwerten eine multiple bivariate Korrelationsanalyse nach Spearman mit anschließender Korrektur nach Benjamini und Hochberg durchgeführt [Bronstein et al., 2000]. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit der Software R mit den Packages „psych“ und „car“ [R Core Team, 2013]. Boxplots, lineare Regressionsanalysen und Mann-Whitney t-Tests wurden mit GraphPad Prism (Version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt. Das p-Level der jeweiligen statistischen Tests wird als $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ angegeben

Poweranalysen als Abschätzung benötigter Stichprobenumfänge unter der Annahme normalverteilter Daten wurden mit der Software R und der R-package „pwr“ durchgeführt und graphisch aufbereitet. So konnten „best-case“ Abschätzungen von Fallzahlen für zukünftige Studien unternommen werden. Bei allen Fallzahlberechnungen wurde ein zweiseitiger T-test und ein alpha von 0.05 angenommen. Die Werte der Power wurden variiert (0.9, 0.8, 0.6, und 0.4) und die Fallzahlen graphisch als Nomogramme ausgegeben. Bei dieser Vorgehensweise handelt es sich um eine Best-Case Betrachtung. Bereits die Annahme normalverteilter

Daten ist nicht zwangsläufig für jeden plazentaren Parameter gegeben, was die Power statistischer Analysen unter die hier errechnete Schwelle mindert.

4. Ergebnisse

4.1. Deskriptive Statistik

Die untersuchte Plazentapopulation bestand aus Plazenten von 26 männlichen (davon 13 durch sectio und 13 via naturalis entbunden) und 24 weiblichen Kindern (davon 11 durch sectio und 13 via naturalis entbunden).

Die Daten der deskriptiven Statistik makroskopischer Parameter mit Mittelwerten und Standardabweichung (SA) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Plazenten sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Die absoluten (Ergebnis der Berechnung nach Formel 4) und relativen (relative Volumenanteile vor Berechnung nach Formel 4) Mittelwerte (+/- SA) der stereologisch untersuchten Parameter der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Plazenten sind in Tabelle 4 aufgeführt. Diese Werte leiten sich aus den sechs Einzelproben jeder Plazenta (Tabelle 5) ab. Die Daten in Tabelle 4 sind nach Aktin positiven (Vorsilbe pos in der Abkürzung) bzw. Aktin negativen Zottenabschnitten (Vorsilbe neg in der Abkürzung) unterteilt. Innerhalb dieser beiden immunhistochemisch definierten Hauptkategorien wurde wiederum nach Stroma (STRO; negSTRO; posSTRO), Gefäßlumen (LUM; negLUM, posLUM), Gefäßendothel (ENDO; negENDO; posENDO) und villösem Trophoblast (SYN; negSYN; posSYN) unterteilt. Zusätzlich werden die Volumina des Fibrinoids (FIB) und des intervillösen Raumes (INTRO) aufgeführt. Die Summenparameter SUZO, SUposZO und SUnegZO sind aus den stereologisch bestimmten Parametern durch Summenbildung abgeleitet (Tabelle 8).

Tabelle 3: Deskriptive Statistik mit Mittelwerten und Standardabweichung makroskopischer Parameter. Gezeigt sind das Gestationsalter (GA), das Geburtsgewicht (GG), Gewicht der Plazenta (PG), das Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht (PG_GG_Ratio), der längste Durchmesser der Plazenta (LDM), der kürzeste Durchmesser der Plazenta (KDM), Oberfläche der Plazenta (OF), Dicke der Plazenta (DICKE), die mittlere Distanz der Gewebeprobe zur Nabelschnurinserterion (Dist zu NS) und die mittlere Distanz der Gewebeprobe zum Rand der Plazenta (Dist. zu RD).

N=50	GA [Wochen]	GG [g]	PG [g]	PG_GG _Ratio	LDM [cm]	KDM [cm]	OF [cm ²]	DICKE [cm]	Dist. zu NS [cm]	Dist. zu RD [cm]
Mittelwert	39,65	3412,00	503,00	0,149	19,63	16,35	1012,00	1,586	7,09	3,30
± SA	± 1,20	± 426,00	± 94,00	± 0,028	± 1,82	± 2,00	± 177,00	± 0,427	± 1,37	± 0,66

Tabelle 4: Deskriptive Statistik mit Mittelwerten (Absolutwerte in ml, Volumenfraktionen in %) sowie absolute und relative Standardabweichung (SA) von mikroskopischen Parametern der gesamten Plazentapopulation. Gezeigt sind Aktin positives und negatives Stroma (posSTRO bzw. negSTRO), Aktin positives und negatives Gefäßlumen (posLUM bzw. negLUM), Aktin positives und negatives Gefäßendothel (posENDO bzw. negENDO), Aktin positives und negatives Synzytium (posSYN bzw. negSYN), die Summenparameter aller Aktin positiven und negativen Zottenbestandteile (SUposZO bzw. SUNegZO), Summe aller Zottenbestandteile (SUZO), Fibrinoid (FIB) und intervillöser Raum (INTRO).

N=50	posSTRO	posLUM	posENDO	posSYN	SUposZO
Mittelwert ± SA	(72,37 ± 20,53) ml	(28,73 ± 13,60) ml	(7,06 ± 3,69) ml	(12,59 ± 5,25) ml	(120,75 ± 36,42) ml
Rel. Mittelwert ± rel. SA	(14,35 ± 28,37) %	(5,70 ± 47,34) %	(1,40 ± 52,27) %	(2,50 ± 41,70) %	(23,94 ± 7,22) %

N=50	negSTRO	negLUM	negENDO	negSYN	SUNegZO
Mittelwert ± SA	(30,30 ± 15,23) ml	(26,31 ± 13,68) ml	(7,89 ± 6,38) ml	(14,74 ± 6,12) ml	(79,23 ± 34,09) ml
Rel. Mittelwert ± rel. SA	(6,01 ± 50,26) %	(5,22 ± 52,00) %	(1,56 ± 80,90) %	(2,93 ± 41,52) %	(15,71 ± 6,76) %

N=50	SUZO	FIB	INTRO	UNDEF
Mittelwert ± SA	(200,00 ± 37,03) ml	(48,08 ± 23,68) ml	(256,27 ± 59,78) ml	(0,93 ± 1,25) ml
Rel. Mittelwert ± rel. SA	(39,66 ± 7,34) %	(9,53 ± 49,25) %	(50,81 ± 23,33) %	(0,18 ± 0,25) %

Tabelle 5: Deskriptive Statistik mit Mittelwert und Standardabweichung Aktin positiver Teilparameter aller Probeentnahmestellen (n = 6 pro Plazenta) jeder der Plazenten (n = 50, Eine Zeile pro Plazenta).

Nr.		posSTRO (ml)	posLUM (ml)	posENDO (ml)	posSYN (ml)
1	Mittelwert ± SD	65,26 ± 24,77	29,24 ± 19,23	6,65 ± 8,07	12,48 ± 10,10
2	Mittelwert ± SD	77,88 ± 22,76	20,82 ± 11,98	4,67 ± 1,49	18,09 ± 8,17
3	Mittelwert ± SD	69,83 ± 26,20	34,96 ± 19,35	7,43 ± 4,89	20,65 ± 11,21
4	Mittelwert ± SD	83,20 ± 29,61	34,51 ± 17,42	8,23 ± 3,65	16,16 ± 6,73
5	Mittelwert ± SD	75,27 ± 19,01	35,02 ± 23,28	7,68 ± 4,83	16,46 ± 4,89
6	Mittelwert ± SD	55,39 ± 20,50	22,72 ± 10,10	11,21 ± 3,38	8,23 ± 6,48
7	Mittelwert ± SD	59,57 ± 5,60	34,00 ± 13,18	11,06 ± 6,24	14,40 ± 3,98
8	Mittelwert ± SD	97,21 ± 38,55	28,59 ± 17,54	6,92 ± 5,16	14,45 ± 8,92
9	Mittelwert ± SD	92,25 ± 23,68	23,63 ± 8,82	6,13 ± 5,11	9,57 ± 5,51
10	Mittelwert ± SD	58,20 ± 21,28	26,72 ± 9,84	12,37 ± 7,42	11,89 ± 7,20
11	Mittelwert ± SD	54,01 ± 11,89	22,40 ± 6,14	7,02 ± 3,84	11,57 ± 7,17
12	Mittelwert ± SD	84,22 ± 23,10	46,20 ± 18,79	11,72 ± 7,80	18,92 ± 10,93
13	Mittelwert ± SD	87,13 ± 18,42	70,67 ± 20,79	5,71 ± 4,04	23,96 ± 11,17
14	Mittelwert ± SD	59,81 ± 14,81	29,75 ± 11,16	4,73 ± 4,16	15,54 ± 9,58
15	Mittelwert ± SD	60,97 ± 11,42	37,53 ± 7,40	6,53 ± 3,43	11,73 ± 5,00
16	Mittelwert ± SD	63,64 ± 10,88	39,18 ± 13,15	9,51 ± 4,31	13,91 ± 3,79
17	Mittelwert ± SD	78,55 ± 15,86	23,65 ± 6,33	6,92 ± 3,52	16,13 ± 9,21
18	Mittelwert ± SD	92,67 ± 33,47	62,98 ± 20,79	16,90 ± 7,62	21,71 ± 7,69
19	Mittelwert ± SD	68,97 ± 18,61	28,44 ± 10,30	4,83 ± 3,39	6,72 ± 1,91
20	Mittelwert ± SD	110,82 ± 32,24	57,16 ± 18,66	8,80 ± 4,36	19,77 ± 7,23
21	Mittelwert ± SD	66,76 ± 15,40	37,97 ± 14,90	5,92 ± 2,97	8,73 ± 7,10
22	Mittelwert ± SD	138,87 ± 55,67	39,47 ± 16,07	10,07 ± 7,80	20,47 ± 5,55
23	Mittelwert ± SD	79,08 ± 12,40	45,32 ± 10,11	9,69 ± 4,05	17,23 ± 7,59
24	Mittelwert ± SD	113,92 ± 27,19	41,45 ± 17,43	9,53 ± 4,72	22,58 ± 8,84
25	Mittelwert ± SD	62,99 ± 17,26	15,21 ± 11,31	4,57 ± 1,40	8,56 ± 4,42
26	Mittelwert ± SD	51,85 ± 13,53	15,18 ± 8,20	2,15 ± 2,18	7,21 ± 4,78
27	Mittelwert ± SD	54,72 ± 3,29	17,28 ± 6,11	4,09 ± 1,79	6,41 ± 3,86
28	Mittelwert ± SD	40,49 ± 12,09	22,75 ± 14,93	4,65 ± 5,56	9,30 ± 6,95
29	Mittelwert ± SD	54,55 ± 13,60	25,25 ± 10,81	3,65 ± 5,09	8,32 ± 6,09
30	Mittelwert ± SD	73,81 ± 28,31	36,71 ± 21,08	6,00 ± 3,98	15,37 ± 6,33
31	Mittelwert ± SD	62,82 ± 9,64	35,98 ± 10,18	6,91 ± 4,39	13,61 ± 5,24
32	Mittelwert ± SD	87,02 ± 26,77	51,73 ± 14,70	14,61 ± 10,76	18,24 ± 14,34
33	Mittelwert ± SD	88,39 ± 46,60	27,12 ± 15,93	5,44 ± 2,51	11,68 ± 3,53
34	Mittelwert ± SD	63,35 ± 18,67	16,57 ± 10,22	3,30 ± 1,85	11,06 ± 7,94
35	Mittelwert ± SD	80,18 ± 11,11	24,28 ± 7,24	5,28 ± 1,94	12,40 ± 6,61
36	Mittelwert ± SD	69,65 ± 29,87	16,77 ± 3,90	2,15 ± 1,31	7,00 ± 4,12
37	Mittelwert ± SD	48,59 ± 15,19	14,07 ± 5,75	5,14 ± 2,87	5,55 ± 2,75
38	Mittelwert ± SD	43,81 ± 9,48	5,90 ± 4,42	2,98 ± 3,23	2,33 ± 2,22
39	Mittelwert ± SD	53,96 ± 11,02	26,01 ± 14,49	4,23 ± 3,52	8,17 ± 7,08
40	Mittelwert ± SD	98,82 ± 21,69	16,61 ± 7,12	3,26 ± 2,33	4,90 ± 2,78
41	Mittelwert ± SD	57,59 ± 19,76	12,98 ± 5,05	4,50 ± 2,52	7,28 ± 4,69
42	Mittelwert ± SD	73,00 ± 19,25	16,67 ± 6,42	3,69 ± 3,85	13,34 ± 5,01
43	Mittelwert ± SD	70,17 ± 26,06	10,93 ± 8,94	3,43 ± 3,66	6,55 ± 3,25
44	Mittelwert ± SD	46,47 ± 16,76	17,39 ± 9,55	3,76 ± 1,91	7,26 ± 5,22
45	Mittelwert ± SD	42,87 ± 23,02	11,09 ± 4,11	3,27 ± 1,76	4,30 ± 2,97
46	Mittelwert ± SD	104,60 ± 49,37	27,43 ± 10,62	16,67 ± 7,97	16,34 ± 7,08
47	Mittelwert ± SD	47,35 ± 8,07	16,71 ± 8,91	6,89 ± 5,54	9,11 ± 7,95
48	Mittelwert ± SD	91,78 ± 14,02	24,58 ± 12,37	8,60 ± 4,55	14,41 ± 8,36
49	Mittelwert ± SD	64,24 ± 18,49	20,54 ± 11,81	7,67 ± 5,69	12,60 ± 9,89
50	Mittelwert ± SD	91,94 ± 16,19	38,15 ± 15,90	16,11 ± 5,12	17,09 ± 4,11
n=50		posSTRO (ml)	posLUM (ml)	posENDO (ml)	posSYN (ml)
	Mittelwert ± SD	72,37 ± 20,53	28,73 ± 13,60	7,06 ± 3,69	12,59 ± 5,25

Tabelle 6: Deskriptive Statistik mit Mittelwert und Standardabweichung Aktin negativer Teilparameter aller Probeentnahmestellen (n = 6 pro Plazenta) jeder der Plazenten (n = 50, Eine Zeile pro Plazenta).

Nr.		negSTRO (ml)	negLUM (ml)	negENDO (ml)	negSYN (ml)
1	Mittelwert ± SD	38,96 ± 21,34	42,61 ± 11,48	8,96 ± 3,97	14,75 ± 7,50
2	Mittelwert ± SD	20,64 ± 9,17	18,06 ± 4,77	5,30 ± 4,58	16,18 ± 7,35
3	Mittelwert ± SD	19,46 ± 6,63	22,90 ± 8,68	7,15 ± 3,14	11,47 ± 5,49
4	Mittelwert ± SD	15,69 ± 7,31	12,44 ± 5,98	3,25 ± 1,99	8,23 ± 6,08
5	Mittelwert ± SD	19,98 ± 8,44	31,25 ± 10,71	9,05 ± 4,13	15,88 ± 5,23
6	Mittelwert ± SD	48,16 ± 16,53	52,18 ± 17,28	42,82 ± 16,16	26,08 ± 9,52
7	Mittelwert ± SD	9,20 ± 4,35	9,87 ± 5,49	2,47 ± 1,02	6,06 ± 3,49
8	Mittelwert ± SD	15,32 ± 6,87	8,15 ± 4,80	1,94 ± 3,02	10,72 ± 7,51
9	Mittelwert ± SD	36,39 ± 10,69	38,26 ± 16,62	7,50 ± 3,25	20,87 ± 8,06
10	Mittelwert ± SD	17,69 ± 12,53	13,48 ± 13,62	4,95 ± 3,99	12,70 ± 11,59
11	Mittelwert ± SD	12,40 ± 2,60	9,87 ± 6,00	3,60 ± 2,61	8,04 ± 2,10
12	Mittelwert ± SD	26,09 ± 5,00	42,15 ± 15,10	13,47 ± 5,27	20,16 ± 8,52
13	Mittelwert ± SD	21,52 ± 8,99	39,77 ± 5,09	4,88 ± 3,10	10,55 ± 8,93
14	Mittelwert ± SD	28,64 ± 10,76	24,64 ± 5,96	4,08 ± 4,27	10,86 ± 4,53
15	Mittelwert ± SD	21,22 ± 6,80	26,07 ± 9,85	6,55 ± 2,77	11,95 ± 3,06
16	Mittelwert ± SD	32,12 ± 9,65	20,09 ± 11,02	4,39 ± 2,37	13,42 ± 4,33
17	Mittelwert ± SD	10,00 ± 6,68	6,12 ± 4,38	1,84 ± 1,70	11,21 ± 11,90
18	Mittelwert ± SD	16,64 ± 10,92	18,92 ± 10,27	2,55 ± 1,42	9,33 ± 4,80
19	Mittelwert ± SD	24,21 ± 8,20	24,40 ± 13,49	8,34 ± 6,28	14,78 ± 7,79
20	Mittelwert ± SD	22,61 ± 6,51	13,38 ± 5,07	2,62 ± 2,06	9,52 ± 7,27
21	Mittelwert ± SD	15,61 ± 8,33	31,55 ± 11,62	6,26 ± 4,22	9,96 ± 3,78
22	Mittelwert ± SD	38,62 ± 11,26	22,54 ± 12,67	3,40 ± 3,17	12,66 ± 5,58
23	Mittelwert ± SD	17,00 ± 7,80	14,35 ± 8,68	2,14 ± 1,66	13,25 ± 16,17
24	Mittelwert ± SD	24,88 ± 3,92	11,87 ± 8,73	2,64 ± 1,63	7,20 ± 2,95
25	Mittelwert ± SD	39,01 ± 17,62	28,90 ± 5,64	9,32 ± 3,32	11,06 ± 6,65
26	Mittelwert ± SD	26,35 ± 7,36	20,27 ± 4,34	5,56 ± 3,36	14,52 ± 7,62
27	Mittelwert ± SD	32,80 ± 18,72	38,04 ± 15,50	9,96 ± 5,50	27,53 ± 4,43
28	Mittelwert ± SD	34,61 ± 9,90	50,15 ± 10,46	12,38 ± 4,82	17,80 ± 6,92
29	Mittelwert ± SD	36,94 ± 11,85	48,26 ± 20,10	8,67 ± 4,71	17,96 ± 4,85
30	Mittelwert ± SD	17,07 ± 6,37	22,15 ± 9,70	5,05 ± 2,98	10,36 ± 7,67
31	Mittelwert ± SD	14,03 ± 2,84	23,51 ± 13,00	3,08 ± 2,26	8,53 ± 6,45
32	Mittelwert ± SD	27,00 ± 12,65	26,22 ± 11,32	13,51 ± 9,56	16,80 ± 6,81
33	Mittelwert ± SD	29,19 ± 12,81	32,73 ± 16,03	5,67 ± 4,14	17,28 ± 9,64
34	Mittelwert ± SD	27,09 ± 10,03	17,09 ± 4,35	9,00 ± 4,62	13,65 ± 3,64
35	Mittelwert ± SD	30,10 ± 13,22	21,68 ± 10,69	4,76 ± 2,04	15,85 ± 8,50
36	Mittelwert ± SD	49,25 ± 12,23	26,98 ± 8,57	8,13 ± 2,97	17,59 ± 6,29
37	Mittelwert ± SD	50,63 ± 11,26	29,69 ± 6,84	11,51 ± 3,74	17,10 ± 5,09
38	Mittelwert ± SD	39,12 ± 13,66	28,10 ± 6,42	12,30 ± 6,99	18,15 ± 5,66
39	Mittelwert ± SD	49,35 ± 13,89	57,73 ± 23,19	11,16 ± 7,44	23,71 ± 10,50
40	Mittelwert ± SD	34,08 ± 10,18	30,68 ± 10,94	8,15 ± 6,40	14,68 ± 10,50
41	Mittelwert ± SD	29,12 ± 13,03	25,78 ± 16,94	8,93 ± 6,96	15,67 ± 5,96
42	Mittelwert ± SD	67,46 ± 12,44	30,00 ± 10,40	13,37 ± 6,34	36,69 ± 6,29
43	Mittelwert ± SD	91,00 ± 26,38	24,36 ± 9,09	12,47 ± 3,75	28,86 ± 7,35
44	Mittelwert ± SD	43,32 ± 12,35	30,37 ± 11,60	9,67 ± 4,93	13,42 ± 5,58
45	Mittelwert ± SD	45,32 ± 13,13	72,81 ± 17,30	19,92 ± 8,23	20,91 ± 5,95
46	Mittelwert ± SD	25,36 ± 9,17	13,73 ± 9,35	4,82 ± 4,69	8,80 ± 6,11
47	Mittelwert ± SD	18,81 ± 8,45	16,30 ± 9,04	3,98 ± 2,61	6,51 ± 3,26
48	Mittelwert ± SD	41,52 ± 5,38	14,83 ± 6,86	4,45 ± 0,86	13,35 ± 4,91
49	Mittelwert ± SD	43,89 ± 12,95	17,05 ± 4,84	11,37 ± 6,30	16,28 ± 6,67
50	Mittelwert ± SD	19,76 ± 11,49	13,39 ± 11,36	6,94 ± 4,71	8,19 ± 5,78
n=50		negSTRO (ml)	negLUM (ml)	negENDO (ml)	negSYN (ml)
	Mittelwert ± SD	30,30 ± 15,23	26,31 ± 13,68	7,89 ± 6,38	14,74 ± 6,12

Tabelle 7: Deskriptive Statistik mit Mittelwert und Standardabweichung der Teilparameter Fibrinoid (FIB), intervillöser Raum (INTRO) und Strukturen ohne Zuordnung zum Zottenbaum (UNDEF) aller Probeentnahmestellen (n = 6 pro Plazenta) jeder der Plazenten (n = 50, Eine Zeile pro Plazenta).

Nr.	FIB (ml)	INTRO (ml)	UNDEF (ml)
1 Mittelwert \pm SD	37,46 \pm 16,84	264,35 \pm 43,24	0,29 \pm 0,71
2 Mittelwert \pm SD	46,85 \pm 17,02	335,26 \pm 54,08	1,25 \pm 2,26
3 Mittelwert \pm SD	31,48 \pm 11,51	281,82 \pm 73,57	0,86 \pm 2,11
4 Mittelwert \pm SD	52,79 \pm 12,57	213,29 \pm 42,28	3,23 \pm 6,48
5 Mittelwert \pm SD	39,34 \pm 19,56	238,81 \pm 33,82	0,28 \pm 0,68
6 Mittelwert \pm SD	45,70 \pm 21,75	267,92 \pm 30,07	4,59 \pm 3,98
7 Mittelwert \pm SD	38,85 \pm 10,57	219,52 \pm 19,33	0,00 \pm 0,00
8 Mittelwert \pm SD	64,76 \pm 67,46	336,93 \pm 68,98	0,00 \pm 0,00
9 Mittelwert \pm SD	78,43 \pm 9,77	305,96 \pm 24,50	0,00 \pm 0,00
10 Mittelwert \pm SD	99,32 \pm 66,72	146,67 \pm 83,99	0,00 \pm 0,00
11 Mittelwert \pm SD	44,53 \pm 20,17	191,37 \pm 26,96	0,20 \pm 0,49
12 Mittelwert \pm SD	110,29 \pm 65,12	382,94 \pm 77,26	0,85 \pm 1,31
13 Mittelwert \pm SD	75,62 \pm 39,28	389,54 \pm 36,40	1,65 \pm 2,55
14 Mittelwert \pm SD	98,29 \pm 16,78	333,32 \pm 53,04	0,33 \pm 0,82
15 Mittelwert \pm SD	51,29 \pm 13,50	258,17 \pm 22,62	0,00 \pm 0,00
16 Mittelwert \pm SD	59,16 \pm 16,82	160,36 \pm 20,40	0,23 \pm 0,56
17 Mittelwert \pm SD	67,76 \pm 67,76	141,43 \pm 74,68	0,41 \pm 1,01
18 Mittelwert \pm SD	50,93 \pm 22,53	214,84 \pm 55,13	2,54 \pm 1,75
19 Mittelwert \pm SD	50,58 \pm 20,02	247,73 \pm 28,32	0,00 \pm 0,00
20 Mittelwert \pm SD	67,43 \pm 28,68	281,30 \pm 44,79	1,60 \pm 2,53
21 Mittelwert \pm SD	38,87 \pm 9,10	344,37 \pm 28,33	0,00 \pm 0,00
22 Mittelwert \pm SD	88,51 \pm 33,15	294,39 \pm 70,85	0,00 \pm 0,00
23 Mittelwert \pm SD	100,79 \pm 106,85	190,16 \pm 94,59	0,00 \pm 0,00
24 Mittelwert \pm SD	70,24 \pm 31,51	281,69 \pm 38,51	0,00 \pm 0,00
25 Mittelwert \pm SD	27,67 \pm 9,25	249,45 \pm 22,15	0,25 \pm 0,62
26 Mittelwert \pm SD	55,18 \pm 25,83	234,72 \pm 25,44	0,00 \pm 0,00
27 Mittelwert \pm SD	45,16 \pm 18,36	287,02 \pm 49,66	0,00 \pm 0,00
28 Mittelwert \pm SD	38,19 \pm 13,29	229,69 \pm 31,43	0,00 \pm 0,00
29 Mittelwert \pm SD	49,26 \pm 13,63	339,14 \pm 25,14	0,00 \pm 0,00
30 Mittelwert \pm SD	34,22 \pm 12,33	210,29 \pm 22,29	0,97 \pm 1,20
31 Mittelwert \pm SD	36,47 \pm 14,45	224,05 \pm 11,99	0,00 \pm 0,00
32 Mittelwert \pm SD	78,88 \pm 34,35	325,99 \pm 52,86	0,00 \pm 0,00
33 Mittelwert \pm SD	40,92 \pm 14,75	221,87 \pm 28,03	2,71 \pm 2,19
34 Mittelwert \pm SD	28,32 \pm 16,99	206,55 \pm 48,49	0,00 \pm 0,00
35 Mittelwert \pm SD	30,46 \pm 15,11	251,95 \pm 24,91	1,06 \pm 1,94
36 Mittelwert \pm SD	35,60 \pm 25,86	254,06 \pm 36,26	0,80 \pm 1,34
37 Mittelwert \pm SD	29,28 \pm 11,62	176,01 \pm 25,31	0,43 \pm 0,66
38 Mittelwert \pm SD	24,53 \pm 15,92	199,99 \pm 31,17	3,80 \pm 3,37
39 Mittelwert \pm SD	14,57 \pm 4,84	292,78 \pm 55,76	3,32 \pm 2,11
40 Mittelwert \pm SD	26,72 \pm 9,64	244,02 \pm 17,72	1,10 \pm 1,34
41 Mittelwert \pm SD	18,28 \pm 8,17	265,82 \pm 20,61	4,04 \pm 6,34
42 Mittelwert \pm SD	49,02 \pm 35,62	370,00 \pm 52,16	0,74 \pm 1,15
43 Mittelwert \pm SD	45,84 \pm 13,41	272,08 \pm 26,20	0,31 \pm 0,76
44 Mittelwert \pm SD	32,44 \pm 9,00	217,82 \pm 39,88	3,08 \pm 2,46
45 Mittelwert \pm SD	21,94 \pm 6,63	211,81 \pm 30,45	0,75 \pm 0,83
46 Mittelwert \pm SD	29,55 \pm 13,16	317,53 \pm 65,78	2,18 \pm 3,61
47 Mittelwert \pm SD	9,42 \pm 5,13	191,92 \pm 15,15	0,00 \pm 0,00
48 Mittelwert \pm SD	18,61 \pm 3,79	271,86 \pm 17,85	0,00 \pm 0,00
49 Mittelwert \pm SD	36,95 \pm 18,45	211,67 \pm 37,45	0,75 \pm 0,82
50 Mittelwert \pm SD	37,04 \pm 11,28	213,31 \pm 47,03	2,08 \pm 3,67
n=50	FIB (ml)	INTRO (ml)	UNDEF (ml)
Mittelwert \pm SD	48,08 \pm 23,68	256,27 \pm 59,78	0,93 \pm 1,25

Tabelle 8: Aus Tabelle 5 als Addition der Mittelwerte abgeleitete Summenparameter Summe Aktin positiver Zotten (SUpozZO), Summe Aktin negativer Zotten (SUnegZO) und Summe aller Zotten (SUZO).

Nr.	SUpozZO (ml)	SUnegZO (ml)	SUZO (mL)
1 Mittelwert	113,63	105,28	218,91
2 Mittelwert	121,46	60,18	181,64
3 Mittelwert	132,87	60,98	193,85
4 Mittelwert	142,10	39,61	181,71
5 Mittelwert	134,43	76,16	210,59
6 Mittelwert	97,55	169,24	266,79
7 Mittelwert	119,03	27,60	146,63
8 Mittelwert	147,17	36,13	183,30
9 Mittelwert	131,58	103,02	234,60
10 Mittelwert	109,18	48,82	158,00
11 Mittelwert	95,00	33,91	128,91
12 Mittelwert	161,06	101,87	262,93
13 Mittelwert	187,47	76,72	264,19
14 Mittelwert	109,83	68,22	178,05
15 Mittelwert	116,76	65,79	182,55
16 Mittelwert	126,24	70,02	196,26
17 Mittelwert	125,25	29,17	154,42
18 Mittelwert	194,26	47,44	241,70
19 Mittelwert	108,96	71,73	180,69
20 Mittelwert	196,55	48,13	244,68
21 Mittelwert	119,38	63,38	182,76
22 Mittelwert	208,88	77,22	286,10
23 Mittelwert	151,32	46,74	198,06
24 Mittelwert	187,48	46,59	234,07
25 Mittelwert	91,33	88,29	179,62
26 Mittelwert	76,39	66,70	143,09
27 Mittelwert	82,50	108,33	190,83
28 Mittelwert	77,19	114,94	192,13
29 Mittelwert	91,77	111,83	203,60
30 Mittelwert	131,89	54,63	186,52
31 Mittelwert	119,32	49,15	168,47
32 Mittelwert	171,60	83,53	255,13
33 Mittelwert	132,63	84,87	217,50
34 Mittelwert	94,28	66,83	161,11
35 Mittelwert	122,14	72,39	194,53
36 Mittelwert	95,57	101,95	197,52
37 Mittelwert	73,35	108,93	182,28
38 Mittelwert	55,02	97,67	152,69
39 Mittelwert	92,37	141,95	234,32
40 Mittelwert	123,59	87,59	211,18
41 Mittelwert	82,35	79,50	161,85
42 Mittelwert	106,70	147,52	254,22
43 Mittelwert	91,08	156,69	247,77
44 Mittelwert	74,88	96,78	171,66
45 Mittelwert	61,53	158,96	220,49
46 Mittelwert	165,04	52,71	217,75
47 Mittelwert	80,06	45,60	125,66
48 Mittelwert	139,37	74,15	213,52
49 Mittelwert	105,05	88,59	193,64
50 Mittelwert	163,29	48,28	211,57
n=50	SUpozZO (ml)	SUnegZO (ml)	SUZO (mL)
Mittelwert \pm SD	120,75 \pm 36,47	79,25 \pm 34,09	200,00 \pm 37,03

4.2. Ergebnisse der multivariaten Korrelationsanalysen

Zunächst wurde durch orientierende Analyse der verschiedenen Parameter geklärt, ob zwischen einzelnen der zu analysierenden Parameter ein offensichtlicher nicht-linearer Zusammenhang bestand. Abbildung 7 zeigt einen Scatterplot aller untersuchten Parameter gegeneinander. Es bestand keine Notwendigkeit, bei einem der Parameter oder Parameterpaarungen nicht-lineare Beziehungen zu unterstellen.

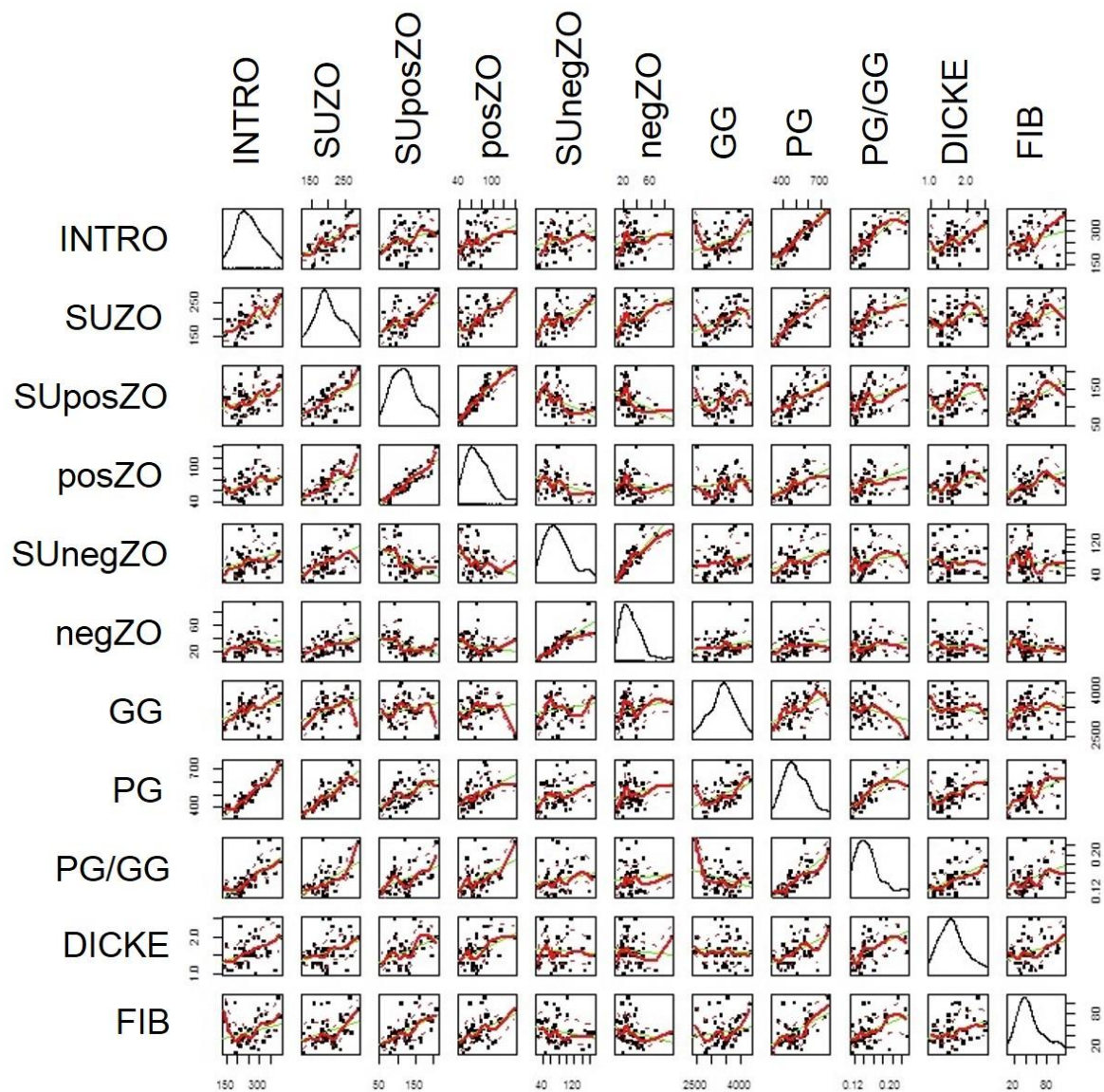


Abbildung 7: Matrix-Scatterplot der wichtigsten Parameter gegeneinander. Die Parameter sind an den Achsen aufgeführt (Intervillöser Raum INTRO, Summe aller Zotten SUZO, Summe Aktin positiver Zotten SUposZO, Stroma Aktin positiver Zotten posSTRO, Summe Aktin negativer Zotten SUnegZO, Stroma Aktin negativer Zotten negSTRO, Geburtsgewicht GG, Plazenta zu Geburtsgewicht PG_GG, Dicke der Plazenta DICKE, Fibrinoid FIB). Die Graphen der diagonalen Felder (identische Paarungen) zeigen Histogramme des jeweils zugehörigen Parameters. Die Graphen der nicht-identischen Paarungen (unterhalb der Diagonalen und oberhalb jeweils in reverser Anordnung der X- und Y- Achsen) zeigen die Datenpunkte in schwarz, den gleitenden Mittelwert als rote Kurve, und die lineare Regression als grüne Gerade mit rot gestrichelter 95% Konfidenzgrenze.

Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten Korrelationsanalyse sind in Abbildung 8 zusammengefasst. Die Abbildung stellt dieselben Parameter zusammen wie in Abbildung 7. Die Abbildung zeigt graphisch den Korrelationsfaktor als

Farbcodierung zwischen -1 und +1 an, wobei +1 eine positive Korrelation, -1 eine negative Korrelation und 0 keine Korrelation anzeigt. Korrelationen, die nach der Korrektur nach Benjamini und Hochberg noch signifikant waren, sind durch weiße Sterne (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$) in den betreffenden Feldern hervorgehoben.

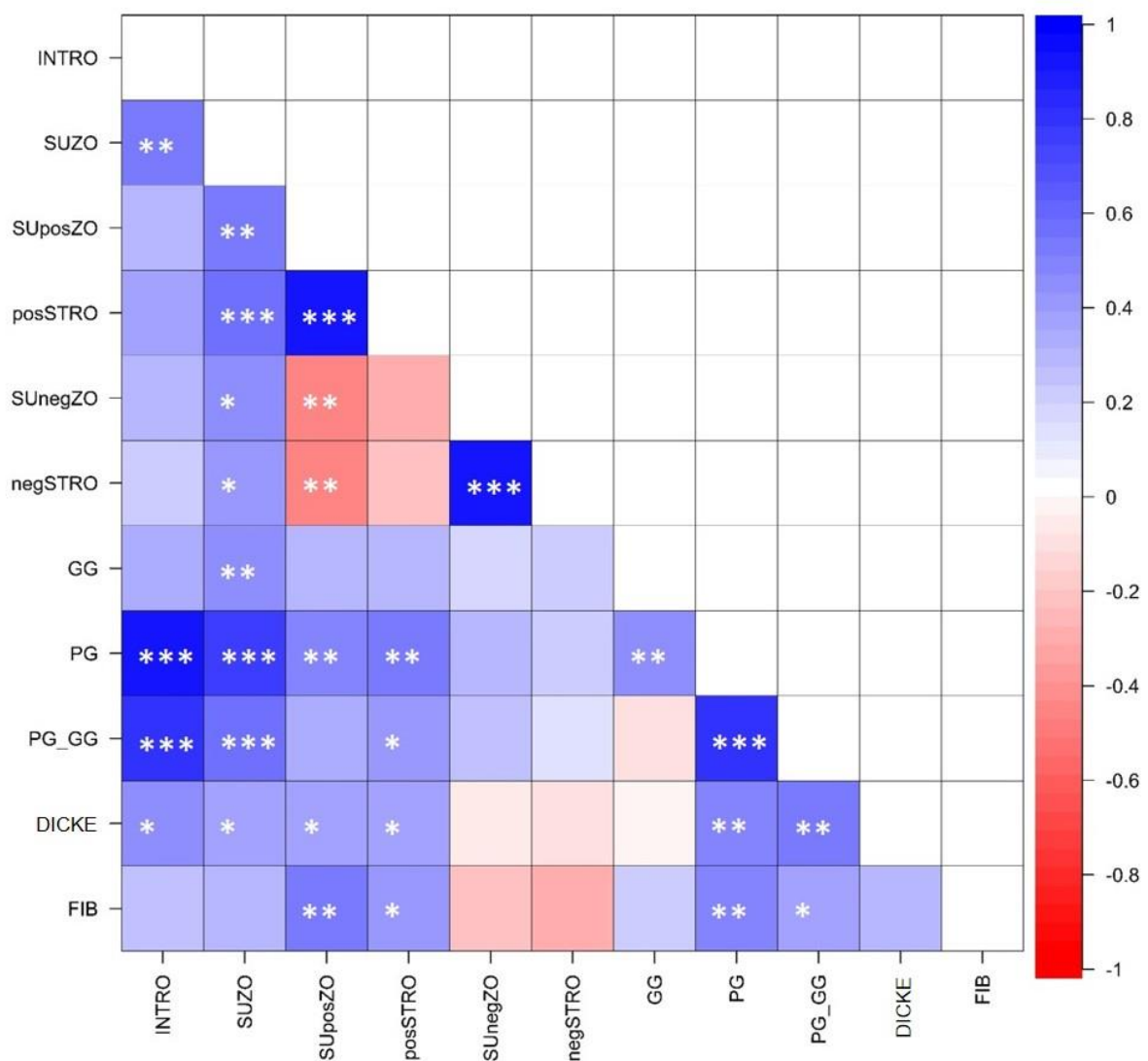


Abbildung 8: Ergebnisse der Korrelationsanalyse in graphischer Darstellung. Die Parameterpaare sind auf der X- und Y-Achse aufgeführt. Nur die Felder unterhalb der Diagonalen sind relevant. In jedem Feld ist der Korrelationsfaktor als Maß für die Stärke der Korrelation farbcodiert angegeben. Die Korrelationsfaktoren sind gemäß der rechts neben dem Graph zu sehenden Farbskala zwischen -1 und +1 codiert, wobei +1 eine positive Korrelation, -1 eine negative Korrelation und 0 keine Korrelation anzeigt, die nach der Korrektur für multiple statistische Vergleiche (nach Benjamini und Hochberg)

statistisch signifikant waren, sind durch weiße Sterne gekennzeichnet. Dabei gilt für die p-Werte: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Es ist zu beobachten, dass die Aktin positiven Zottenanteile (SUposZO) und die entsprechenden Aktin negativen Zottenanteile (SUnegZO, negSTRO) negativ miteinander korrelieren. Makroskopisch und mikroskopisch wichtige plazentare Parameter (PG, DICKE, FIB) hängen statistisch signifikant in positiver Korrelation nur mit den Aktin positiven Zottenanteilen zusammen. Die Aktin negativen Zottenanteile liefern hier offensichtlich nur einen statistisch nicht signifikanten Beitrag, der zudem eine im Vorzeichen umgekehrte, negative Korrelation darstellt. Die verschiedenen Einzelparameter der Summenparameter (SUposZO, SUnegZO) verhielten sich jeweils nicht anders als die zugehörigen Summenparameter. Dies ist in einer erweiterten Version der Korrelationsanalyse gezeigt, in der auch die verschiedenen Teilparameter der Summenparameter SUposZO und SUnegZO graphisch wiedergegeben werden (Abbildung 9).

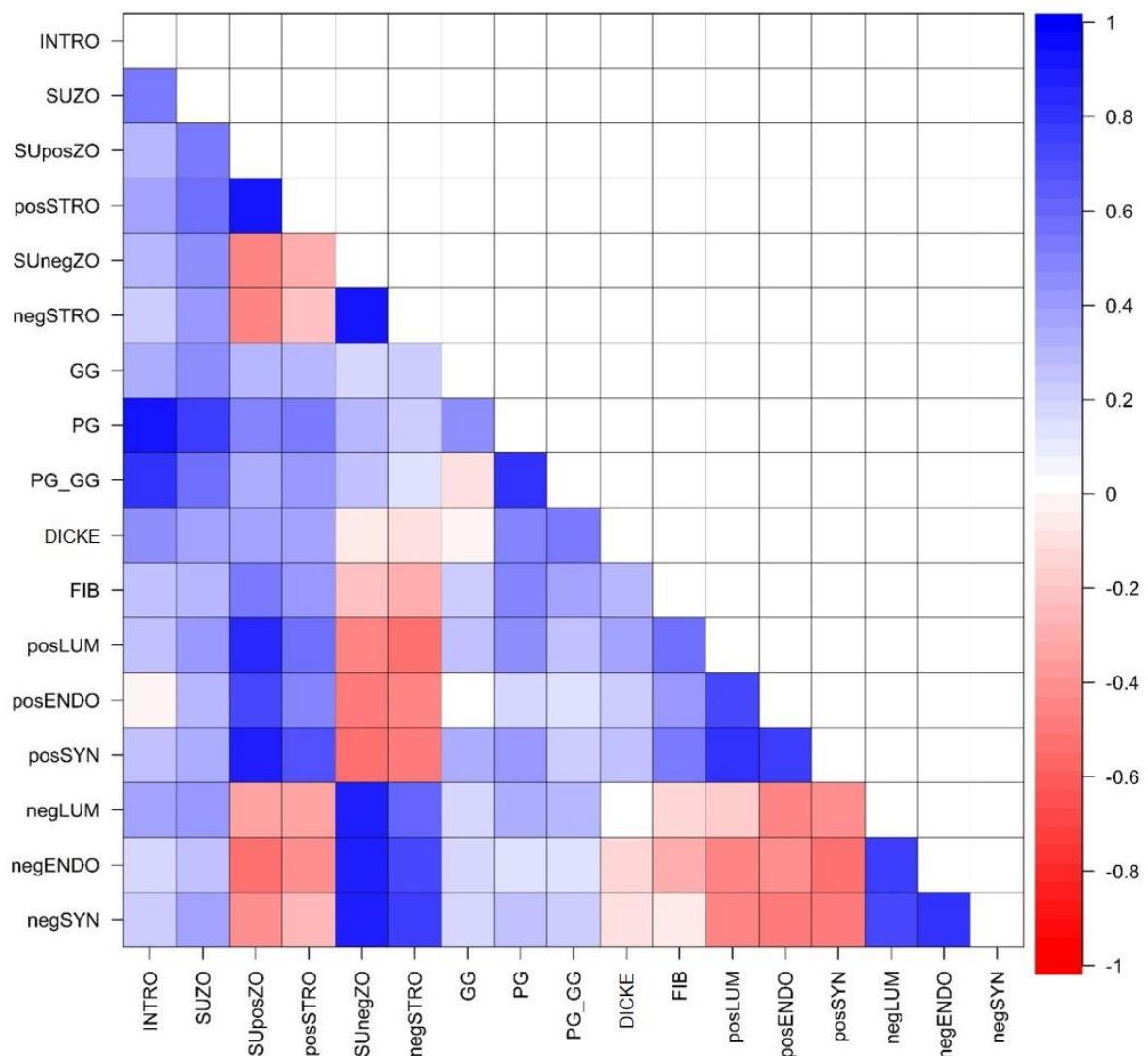


Abbildung 9: Ergebnisse der Korrelationsanalyse in graphischer Darstellung. Die Parameterpaare sind auf der X- und Y-Achse aufgeführt. Nur die Felder unterhalb der Diagonale sind relevant. In Ergänzung zu Abbildung 8 sind hier auch die Parameter Aktin positives Lumen (posLUM), Aktin positives Endothel (posENDO), Aktin positives Synzytium (posSYN), Aktin negatives Lumen (negLUM), Aktin negatives Endothel (negENDO), und Aktin negatives Synzytium (negSYN) in die Darstellung (auf der X-Achse rechts neben Fibrinoid FIB; auf der Y-Achse unterhalb von Fibrinoid FIB) einbezogen. In jedem Feld ist der Korrelationsfaktor als Maß für die Stärke der Korrelation farbcodiert angegeben. Die Korrelationsfaktoren sind gemäß der rechts neben dem Graph zu sehenden Farbskala zwischen -1 und +1 codiert, wobei +1 eine positive Korrelation, -1 eine negative Korrelation und 0 keine Korrelation anzeigt.

4.3. Analyse ausgewählter Korrelationen

4.3.1. Einfluss von Entbindungsmodus und Geschlecht

Der Entbindungsmodus zeigte auf das Volumen des intervillösen Raumes (INTRO), sowie auf das Kapillarlumen Aktin negativer Zottenbestandteile (negLUM) einen statistisch signifikanten Einfluss. In beiden Fällen ist das jeweilige Volumen nach vaginaler Entbindung niedriger als nach Kaiserschnitt (sectio) (siehe Abbildung 10). Das kindliche Geschlecht hatte auf keinen der in dieser Arbeit untersuchten Parameter einen statistisch signifikanten Einfluss.

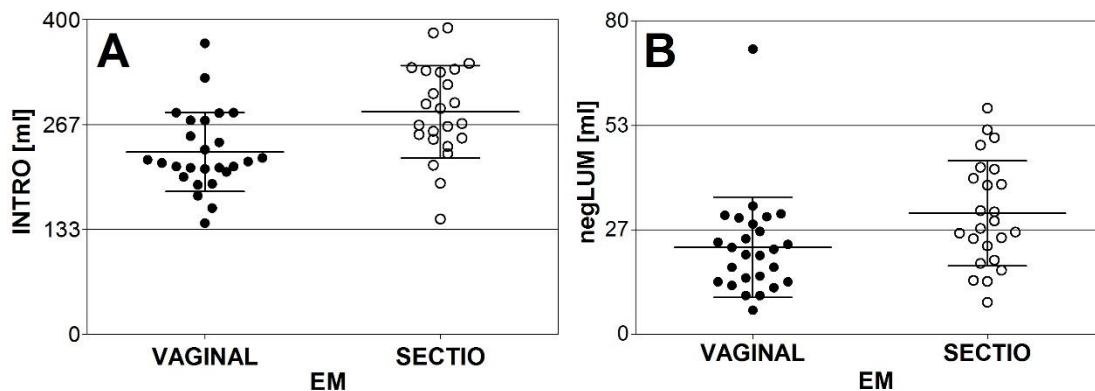


Abbildung 10: Boxplot Diagramm von intervillösem Raum (INTRO) und Aktin negativem Lumen (negLUM) bei unterschiedlichem Entbindungsmodus (EM, vaginal / sectio). Es wurde ein signifikanter Volumenunterschied zwischen vaginaler Entbindung und Entbindung durch sectio bei dem Gefäßlumen Aktin negativer Zotten (negLUM; Diagramm A; Mann-Whitney t-Test $p < 0,05$) und des intervillösen Raumes (INTRO; Diagramm B; Mann-Whitney t-Test $p < 0,01$) festgestellt.

4.3.2. Korrelation der Werte Aktin positiver Zotten mit Fibrinoid, makroskopischen und klinischen Parametern

Die Aktin positiven Zottenbestandteile (SUposZO, posSTRO) korrelierten statistisch signifikant und positiv mit den makroskopischen Parametern PG und DICKE sowie dem mikroskopischen Parameter FIB. Diese Parameter werden in Abbildung 11 zusammengestellt und mittels linearer Regressionsanalyse weiter analysiert.

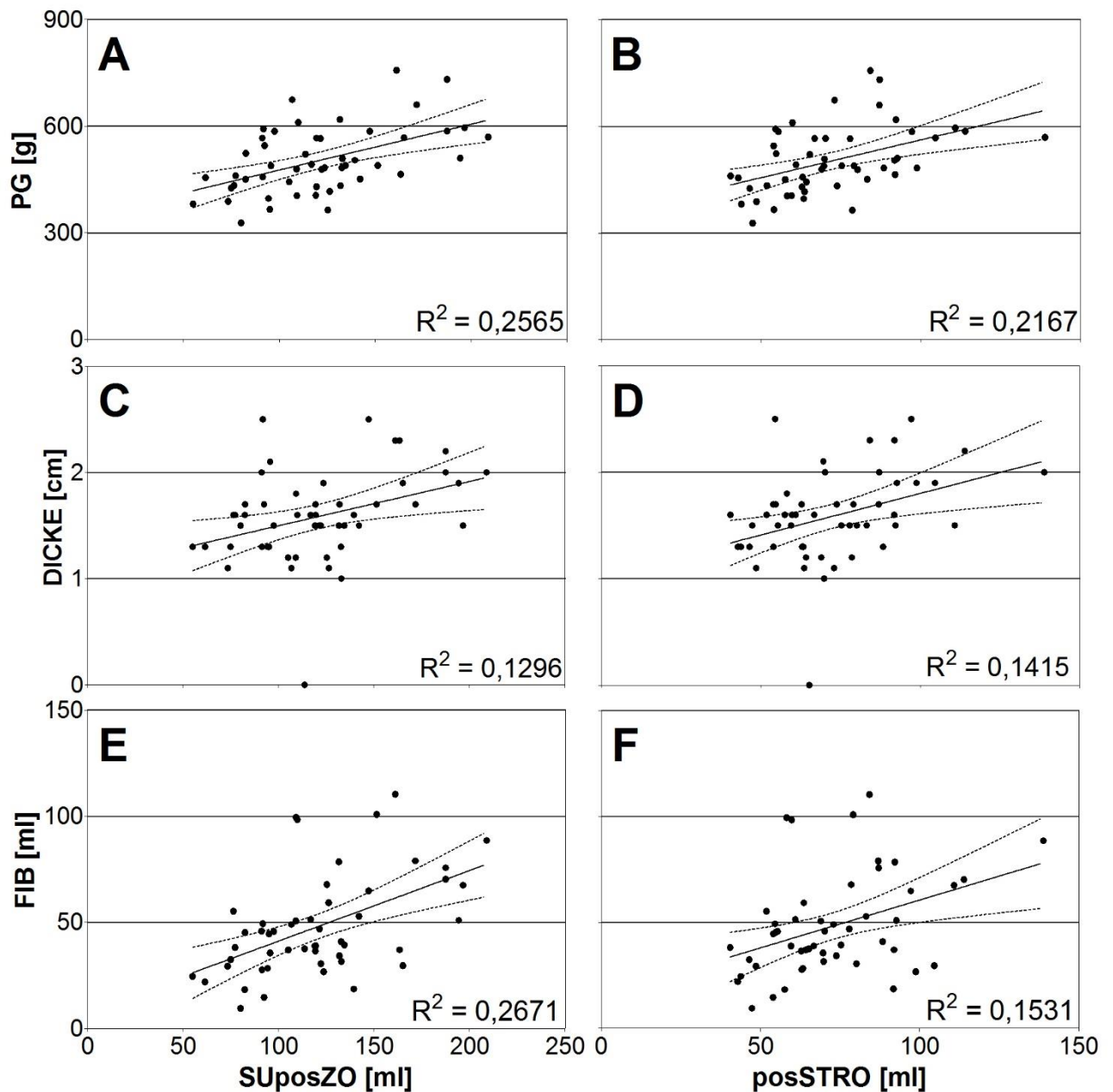


Abbildung 11: Lineare Regressionsanalysen der Parameter Summe positiver Zotten (SUposZO) und Aktin positives Stroma (posSTRO) mit dem Plazentagewicht (PG) (Diagramm A, B), Dicke der Plazenta (DICKE) (Diagramm C, D) und Fibrinoid (FIB) (Diagramm E, F). Die Graphen zeigen die Datenpunkte (jeder Punkt entspricht einer Plazenta), die Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und das 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linie). Angegeben sind die R^2 -Werte der linearen Regressionsanalyse. Die p-Werte (Steigung unterschiedlich von Null) der linearen Regressionsanalyse ergaben sich zu $p < 0,001$ (Diagramm A), $p < 0,001$ (Diagramm B), $p < 0,05$ (Diagramm C), $p < 0,01$ (Diagramm D), $p < 0,001$ (Diagramm E) und $p < 0,01$ (Diagramm F).

4.3.3. Korrelation der Volumina von Fibrinoid und intervillösem Raum mit anderen makroskopischen Parametern

Im Vergleich der Mittelwerte der mikroskopischen Parameter FIB und INTRO mit makroskopischen Parametern (PG, GG, PG_GG_ratio und DICKE) der gesamten Plazentapopulation ($n = 50$) zeigte sich, dass mit steigendem PG der Volumenanteil an FIB zunimmt (Abbildung 12 (A); $p < 0,01$). Der Volumenanteil von INTRO nimmt mit steigendem PG (Abbildung 12 (B); $p < 0,001$), zunehmendem Verhältnis von PG_GG_ratio (Abbildung 12 (C); $p < 0,001$) sowie bei zunehmender DICKE der Plazenten signifikant zu (Abbildung 12 (D); $p < 0,01$).

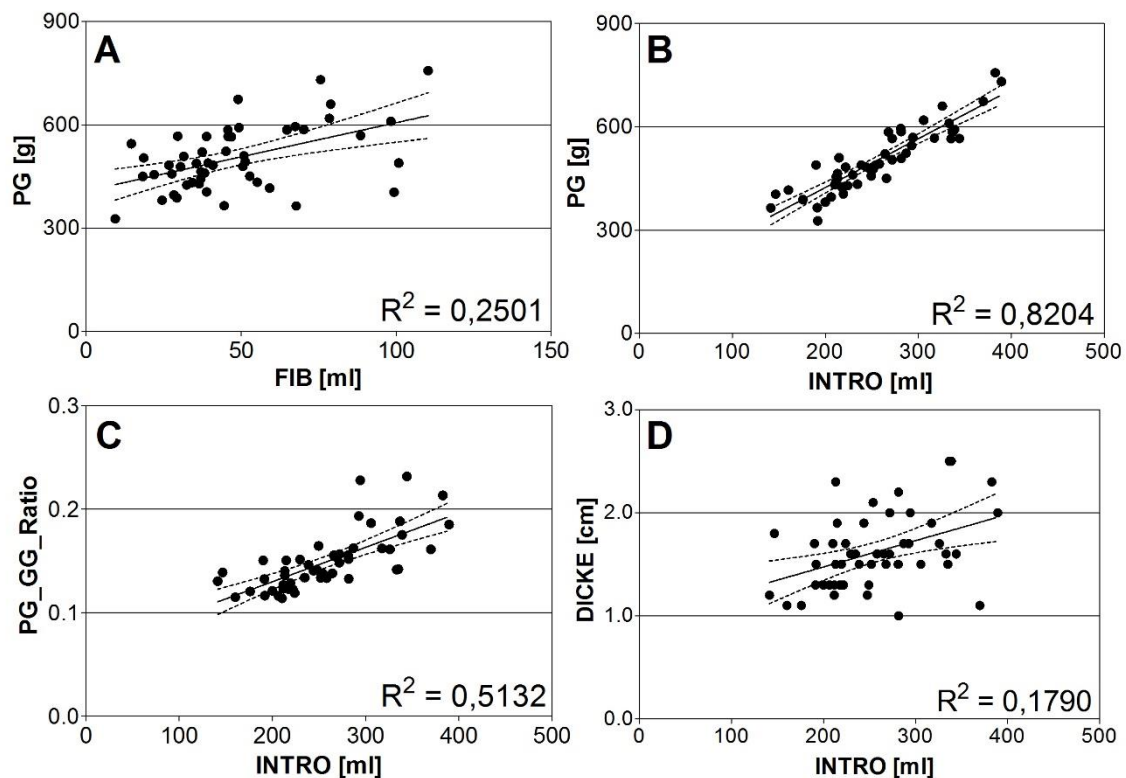


Abbildung 12: Diagramm A zeigt das Volumen von Fibrinoid (FIB) in Abhängigkeit von dem Plazentagewicht (PG). In Diagramm B ist das Volumen des intervillösen Raumes (INTRO) in Abhängigkeit von Plazentagewicht (PG), in Diagramm C das Verhältnis von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht (PG_GG_ratio) beziehungsweise Diagramm D der Dicke (DICKE) der Plazenta dargestellt. Unten rechts im Diagramm sind die entsprechenden R^2 -Wert der linearen Regressionsanalyse wiedergegeben. Die p-Werte (Steigung unterschiedlich von Null) der linearen Regressionsanalyse ergaben sich zu $p < 0,001$ (Diagramm A), $p < 0,001$ (Diagramm B), $p < 0,001$ (Diagramm C) und $p < 0,01$ (Diagramm D).

4.4. Einfluss der Entfernung der Probe von Plazentarand und Nabelschnurinserterion

4.4.1. Einfluss der Entfernung der Probe vom äußeren Plazentarand

In dieser Analyse wurde untersucht, ob die Entfernung des Gewebeentnahmeortes zum äußeren Plazentarand einen Einfluss auf die Zottenarchitektur aufweist. Dazu wurden die Volumenanteile der unterschiedlichen mikroskopischen Parameter jeder untersuchten Gewebeprobe ($n = 300$) in Abhängigkeit von der individuellen Entfernung jeder Gewebeprobe zum äußeren Rand der Plazenten analysiert. Zunächst wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Bei korrelierenden Parametern erfolgte anschließend eine lineare Regressionsanalyse. Eine Korrelation in der Analyse nach Spearman ergab sich lediglich bei den Parametern INTRO ($p < 0,001$) und negLUM ($p < 0,05$). In Abbildung 13 ist der Zusammenhang des Abstandes zum äußeren Rand der Plazenta zu den Volumina von INTRO (Diagramm A) und negLUM (Diagramm B) grafisch dargestellt. Lediglich bei dem Parameter INTRO erwies sich die Steigung signifikant von null verschieden ($p = 0,05$).

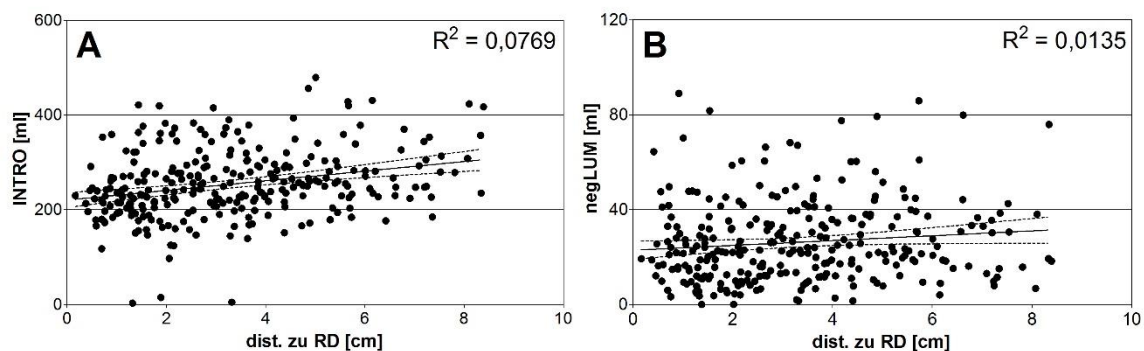


Abbildung 13: Zusammenhang der mikroskopischen Parameter INTRO (Diagramm A) und negLUM (Diagramm B) ($n=300$) mit dem jeweiligem Abstand der Gewebeprobe zum äußeren Rand (RD) der Plazenta. In der oberen rechten Ecke ist der Regressionskoeffizient R^2 angegeben. Die p-Werte (Steigung unterschiedlich von null) der linearen Regressionsanalyse ergaben sich zu $p < 0,001$ (Diagramm A) und $p = 0,05$ (Diagramm B).

4.4.2. Einfluss der Entfernung der Probe von der Nabelschnurinsertion

Hierbei konnte kein statistischer Zusammenhang der mikroskopisch untersuchten Parameter mit ihrem jeweiligen Abstand zur Nabelschnurinsertion gefunden werden.

4.5. Poweranalyse und Stichprobenumfang

In der Software R wurde ein t-Test simuliert und eine Normalverteilung der Daten angenommen. Vorgegeben waren verschiedene Stufen der Power des t-Tests sowie ein generelles Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$. Die Fallzahlen wurden zunächst bezogen auf die Effektstärke graphisch ausgegeben und für jeden einzelnen Parameter dann die absoluten und relativen Mittelwertsdifferenzen, die der jeweiligen Effektstärke entsprechen, auf untereinander angeordneten X-Achsen aufgeführt. Auf diese Weise entsteht ein Nomogramm, auf dem sich graphisch ablesen lässt, welche Fallzahlen unter den oben angeführten Bedingungen mindestens nötig sind, um für den jeweiligen Parameter vorhandene Unterschiede mit ausreichender Sicherheit signifikant testen zu können. Das Nomogramm ist hier als Abbildung 14 wiedergegeben.

Nomogramm zur Fallzahlermittlung (T-Test, zweiseitig; alpha=0,05)

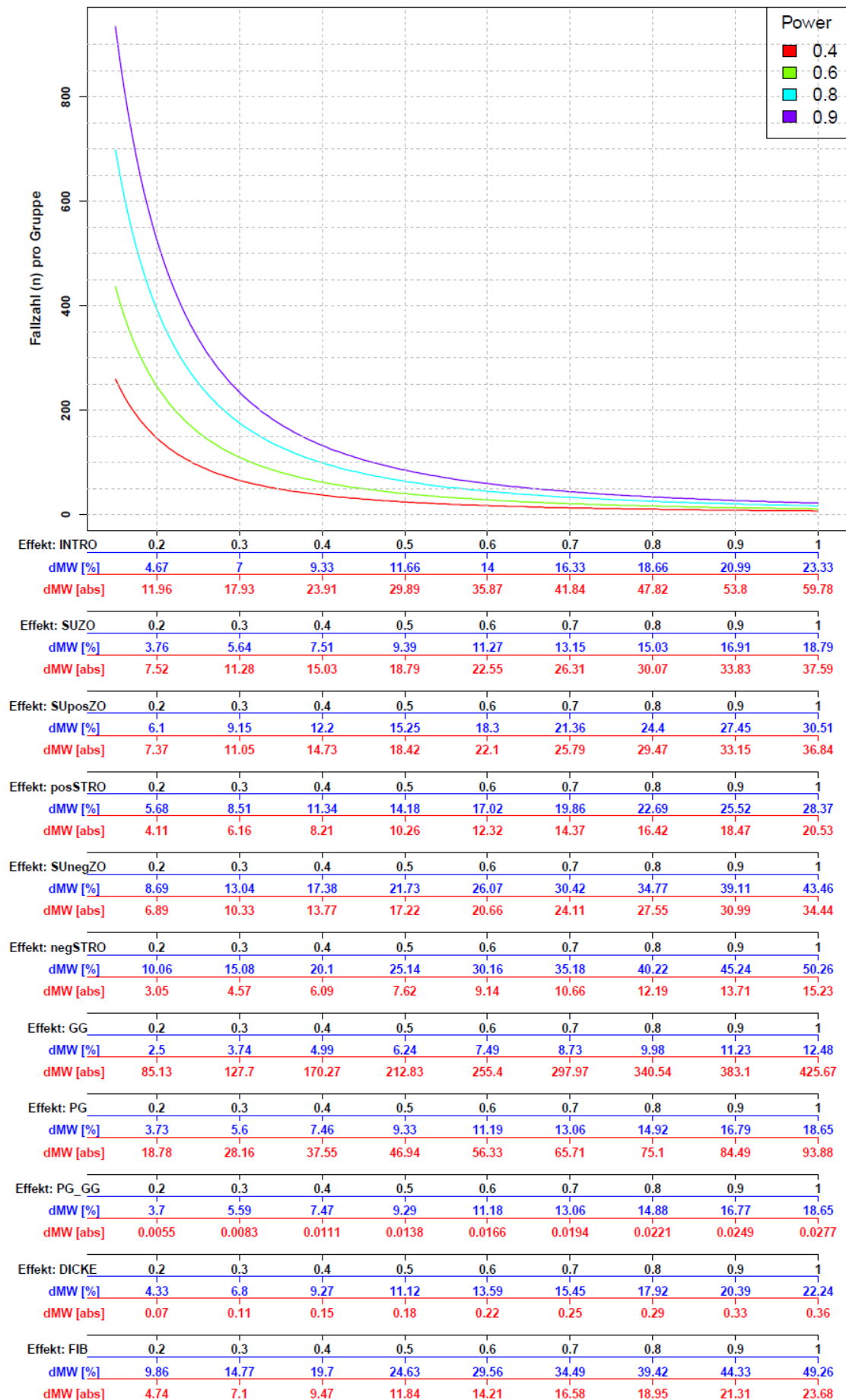


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt im oberen Abschnitt einen Graphen, der Fallzahlkurven wiedergibt. Die Fallzahlen sind auf der Y-Achse abzulesen und werden für verschiedene Level der statistischen Power farbcodiert (der Farbcode ist rechts oben im Graphen wiedergegeben). Es sind dann diejenigen Fallzahlen, die bei der jeweiligen Effektstärke (X-Achse) und Power die Mittelwertdifferenz zwischen zu vergleichenden Populationen statistisch signifikant werden lassen. Die X-Achse gibt die für die Fallzahlabeschätzung zugrunde gelegte Effektstärke (in schwarz, repetitiv für die hier aufgelisteten Parameter der vorliegenden Studie) wieder. Die einheitslose Maßzahl für die Effektstärke nimmt dabei entlang der X-Achse bis zu einem Wert von 1 zu, der bereits eine sehr deutliche Mittelwertdifferenz zwischen den zu vergleichenden Populationen in der statistischen Analyse impliziert. Neben der Effektstärke wird für jeden der aufgeführten Parameter auch angegeben, welche relative Mittelwertdifferenz (dMW [%]; blau) und absolute Mittelwertdifferenz (dMW [abs]; rot) der zugehörigen Effektstärke entspricht. Die Abbildung kann insgesamt als ein Nomogramm zur Abschätzung sinnvoller Fallzahlen bei gruppenvergleichenden Plazentastudien dienen.

5. Diskussion

5.1. Übersicht zur vorliegenden Studie

In dieser Studie wurde die klinisch unauffällige menschliche Plazenta stereologisch analysiert und die absoluten Volumina einzelner Zottenstrukturen berechnet. Dabei wurden die Zottenstrukturen Stroma, Gefäßlumen, Gefäßendothel und Synzytium von Aktin positiven und Aktin negativen Zotten, sowie Fibrinoid und intervillöser Raum bestimmt. Die Einteilung in Aktin positive und Aktin negative Zotten erfolgte mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung. Bei dieser Färbung handelt es sich um eine spezifische Bindung von Antikörpern an die gamma-Isoform des muskulären Aktins (γ -sm-Aktin) glatter Muskelzellen, welches in den Myofibroblasten der perivaskulären Manschette von Stammzotten exprimiert wird [Demir et al., 1997]. Die Gewebeentnahme erfolgte durch „systematic random sampling“, um vor allem der intraplazentaren Variabilität sowie ortsgebundenen Schwankungen innerhalb der Plazenta statistisch gerecht zu werden.

Zusammenhänge mikroskopischer Bestandteile der Plazenta untereinander wurden durch umfangreiche statistische Analysen ermittelt (siehe Kapitel 4.2). Alle mikroskopischen Zottenbestandteile wurden in weiteren Analysen mit makroskopischen Parametern der Plazenta verglichen, um potentielle Einflüsse auf die makroskopische Plazenta zu untersuchen (siehe Kapitel 4.3). Zusätzlich wurde zu jeder Gewebeprobe die Lage in Bezug zum Rand der Plazenta und zur Nabelschnurinsertion bestimmt und in die Interpretation der Daten einbezogen (siehe Kapitel 4.4). Im Mittelpunkt dieser Analyse standen die makroskopischen Parameter Geburtsgewicht des Kindes (GG), Plazentagewicht (PG), das Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht (PG_GG_ratio) als ein Maß für die Effizienz der Plazenta, sowie die Dicke der Plazenta. Um Einflüsse auf die erhobenen Daten durch den Entbindungsmodus und das Geschlecht des Kindes zu erkennen, wurden der Geburtsmodus und das Geschlecht des Kindes in der Analyse der Daten

berücksichtigt. Folgend werden in einzelnen Kapiteln die jeweiligen Ergebnisse besprochen und diskutiert.

5.2. Zur Bedeutung der immunhistochemischen Unterteilung des Zottenbaumes

In früheren Untersuchungen der menschlichen Plazenta wurden die Zotten entweder pauschal zusammenfassend analysiert oder anhand ihres Durchmessers bzw. anhand der Stromazusammensetzung (z.B. des Vorkommens einer Tunica media in zentralen Zottengefäßen) klassifiziert [Aherne et al., 1966; Boyd, 1984; Ali et al., 1996; Mayhew, 2002; Egbor et al., 2006; Almasry et al., 2012]. Meist wurden hier einfache histologische Färbetechniken (z.B. die Hämatoxylin-Eosin Färbung) verwendet, welche allerdings zu unspezifisch sind, um eine vom Untersucher unabhängige, reproduzierbare Einteilung zu gewährleisten [Haeussner et al., 2015]. Die am häufigsten genutzte Einteilung von Zotten nach diesen Gesichtspunkten erfolgte nach Kaufmann et al. [1979] anhand ihres Durchmessers (Kalibermessung) und der stromalen, histologischen Struktur. Bei den Durchmessern der Zottenabschnitte wurde ab einem Durchmesser von größer als 50 µm von einer Stammzotte und bei einem Durchmesser von kleiner als 60 µm von einer Intermediär- / Terminalzotte ausgegangen. Der Überlappungsbereich von 10 µm macht bereits klar, dass eine eindeutige Klassifikation der Zotten anhand der rein histologischen Eigenschaften solcher Zottenabschnitte schwerlich möglich ist. Andere Kriterien für die Zottenklassifikation basierten auf An- oder Abwesenheit qualitativer, stromaler Eigenschaften, wie Stromakanäle und Kapillarmuster. Letztere Kriterien waren die wesentliche Basis für die positive Identifikation von reifen und unreifen Intermediärzotten und den sogenannten Terminalzotten. Intermediär- und Terminalzotten sind in der Einteilung nach Kaufmann die periphersten Verästelungen des Zottenbaumes; daher auch die Nomenklatur. Wie problematisch die Zuordnung von topologischen Positionen (Terminal-, Intermediär-) auf Basis dieser qualitativen Eigenschaften von Zottenanschnitten ist, konnte vor kurzem in einer Validierungsstudie gezeigt werden [Haeussner et al., 2015]. Die von Untersuchern blind erhobenen topologischen Klassifikationen stimmten weder zwischen den

Untersuchern noch mit der tatsächlichen Lage in einem für diagnostische Aussagen zufriedenstellenden Maße überein [Haeussner et al., 2015]. In der gleichen Studie wurde auch die Empfehlung ausgesprochen die starke Abhängigkeit der klassischen Zottenklassifikation vom Untersucher durch einen objektiveren und vor allem untersucherunabhängigen Nachweis von Differenzierungsmarkern – unter expliziter Erwähnung der gamma-Isoform des Aktins – am Schnitt zu ersetzen. Die hier vorliegende Studie setzt diese Empfehlung um und verwendet die klassische Unterteilung in Zottentypen nicht.

Die einzelnen Zottenbestandteile der menschlichen Plazenta wurden in dieser Arbeit anhand einer immunhistochemischen Färbung in Aktin positive und Aktin negative Zottenabschnitte eingeteilt (für Beispiele siehe Abbildung 5 und Abbildung 6, Kapitel 3.4). Hierbei bindet ein Antikörper (anti- γ -sm-Aktin) an das Aktin, das massiv in der perivaskulären Manschette von großkalibrigen und zentral im Zottenbaum positionierten Zotten vorkommt; diese großkalibrigen, teilweise mehrere 100 μ m im Durchmesser betragenden Zotten gehören nach der klassischen histologischen Nomenklatur eindeutig zu den Stammzotten. Aber auch in vielen Zottenabschnitten kleineren Kalibers, die nicht mehr objektiv in klassischer histologischer Weise klassifiziert werden können (s.o.) finden sich perivaskulär schmale Lagen Aktin positiver Zellen oder gar nur einzelne Aktin positive Zellen. Alle Zotten, die perivaskuläre Aktin-positive Zellen aufwiesen, wurden im Pool der Aktin positiven Zotten zusammengefasst. Dieser umfasst damit klassische Stammzotten, reicht aber über diese klassische Begriffsweise hinaus auch in den Bereich der bisher nur schwer eindeutig klassifizierbaren Zottenabschnitte hinein. Alle Zotten ohne perivaskuläre, stromale Aktin-Reaktivität wurden als Aktin negativ klassifiziert. Die Funktionen der perivaskulären kontraktilen Zellen in den Zotten wurden vielfach diskutiert. Diese Diskussion ist noch nicht abgeschlossen, obwohl klar ist, dass die Zotten mit diesen kontraktilen Elementen funktionelle Besonderheiten aufweisen. Die Einteilung der Zottenabschnitte nach der Aktin-Reaktivität gliedert die auftretenden Zottentypen des Zottenbaumes damit auch nach unterschiedlichen Funktionen, die sie innerhalb des Zottenbaumes einnehmen können. Zotten mit einer perivaskulären und kontraktilen Zellpopulation (Aktin positiv) sind dabei wohl vor allem der Blutleitung zu den peripheren Austauschgebieten zuzuordnen, ggf. auch der Widerstandskontrolle oder der Strukturstabilisierung [Graf et al., 1994; Graf et al., 1995a; Demir et al., 1997;

Frank, 2011; Benirschke et al., 2012]. Die Aktin-freien (Aktin negativen) Zotten sind kleinkalibrige Zotten, die auch histologisch dem Bild der Intermediär- bzw. Terminalzotte entsprechen (für Beispiele siehe Abbildung 5 und Abbildung 6). Durch kapillarreiche und stromaarme Intermediär- / Terminalzotten, in denen perivaskuläre Aktin positive Zellen nicht erwartet werden [Demir et al., 1997] wird ein Großteil des Stoffaustausches zwischen Mutter und Kind bewerkstelligt. Aufgrund der hier vorhandenen Anzahl an fetalen Kapillaren, ihrer verhältnismäßig großen Oberfläche und des geringen räumlichen Abstandes zum mütterlichen Blut wird hier der diffusive Transport begünstigt [Mayhew et al., 1993; Benirschke und Kaufmann, 2000].

In der hier vorliegenden Arbeit wird demnach erstmals eine systematische und nur von der Immunreaktivität bestimmte – d.h. weitgehend beobachterunabhängige - Einteilung der Zottentypen als qualitative Grundlage für eine quantitative Analyse des Zottenbaumes durchgeführt. Die Klassifikation nach Aktin positiv und Aktin negativ erlaubt ebenfalls, Aussagen über den Aufbau des Zottenbaums und möglicherweise auch dessen Effizienz zu machen. Eine neue Option für die systematische Untersuchung von pathologischen Plazenten steht somit zur Verfügung. Die ausführlichen Daten der vorliegenden Studie an ausschließlich klinisch unauffälligen Plazenten soll die Datenbasis einer immunhistochemisch unterstützten, quantitativen Auswertung bieten, die von hier aus vergleichend auf Plazenten nach Schwangerschaftskomplikationen wie Wachstumsretardierung oder Präeklampsie ausgedehnt werden kann.

5.3. Vergleich der Daten der aktuellen Studie mit Literaturdaten

Ziel dieser Studie war es, die klinisch unauffällige menschliche Plazenta systematisch in ihrem mikroskopischen und makroskopischen Aufbau zu charakterisieren. In Bezug auf die verwendete Färbung sowie im Hinblick auf den Proben- und Messumfang liefert diese Studie umfangreiche Referenzwerte der klinisch unauffälligen menschlichen Plazenta. Ungeachtet des Mess- und Probenumfangs birgt diese Studie folgende Möglichkeiten der detaillierten Auswertung der Daten und hebt sich daher von bisher veröffentlichten Studien ab:

-
- Es wurden die unterschiedlichen Zottenbestandteile wie das Gefäßendothel, das Stroma, der Synzytiotrophoblast und das Gefäßlumen der unterschiedlichen Zottentypen einzeln quantifiziert.
 - Zusammenhänge mikroskopischer Strukturen mit makroskopischen Parametern, z.B. in Hinblick auf die Entfernung der Gewebeprobe zur Nabelschnurinsertion bzw. zum Rand der Plazenta konnten evaluiert werden.
 - Einflüsse des Entbindungsmodus auf die untersuchten Zottenbestandteile konnten ermittelt werden.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit bestimmten mikroskopischen Daten mit bisher veröffentlichten Untersuchungen aus zwei Gründen nur schwer durchführbar. Zum Einen ist hinreichend bekannt, dass die Volumina biologischer Strukturen in histologischen Schnitten stark von dem Einbettungsverfahren beeinflusst werden [Luckhardt et al., 1996; Quester und Schröder, 1997], was Vergleiche zwischen Studien mit abweichenden Einbettungsverfahren erschwert. Zum Anderen wurden Zotten in dieser Studie völlig neu klassifiziert (wie bereits in Kapitel 5.2 diskutiert), was den Vergleich zur bisher häufig verwendeten Klassifikation nach Kaufmann [1979] schwierig macht. Letztere ist allerdings auch nicht mehr als allgemein akzeptierter Referenzpunkt zu betrachten [Haeussner et al. 2015], da sich erhebliche Probleme bei der Reproduzierbarkeit der histologischen Zuordnungen gezeigt haben, die wohl vor allem auf eine ausgeprägte Abhängigkeit der Klassifizierungsergebnisse vom Beobachter zurückzuführen sind. Diese Beobachtung mag durch einen Vergleich mit den Daten von Mayhew et al. [2003] verdeutlicht werden. In dieser Arbeit wurde der Zottenbaum ebenfalls unterteilt, allerdings nach der klassischen histologischen Nomenklatur in Stammzotten, Intermediärzotten und Terminalzotten. Die Summenaufteilung der stereologisch bestimmten Volumina auf intervillösen Raum (256 ml in der vorliegenden Studie; 276 ml bei Mayhew et al. [2003]) und Gesamtzottenbaum (248 ml als Summe aus SUZO und FIB in der vorliegenden Studie; 259 ml bei Mayhew et al. [2003]) ist dabei zwischen beiden Studien noch vergleichbar und zeigt Ähnlichkeiten der zugrundeliegenden Plazenta-Populationen. Der Anteil der Aktin positiven Zotten im Zottenbaum ist in der vorliegenden Studie (127 ml) jedoch viel größer als der Anteil der als Stammzotten klassifizierten Zotten (35 ml) bei Mayhew et al. [2003]; umgekehrt ist diese Situation im Prinzip bei Intermediär- und

Terminalzotten. Damit kann nicht einfach davon ausgegangen werden, dass die klassisch-histologische Klassifikation in Stammzotten und (prä-) terminale Zotten nur ein Analogon der Aufteilung Aktin positive und Aktin negative Zotten wäre. Es handelt sich um verschiedene Zottenpopulationen, die in dieser Einteilung erfasst werden. Die vorliegende Studie macht sich dabei die weitgehende Beobachter-unabhängige Immunhistochemie zunutze, ein Weg, den schon Haeussner et al. [2015] als möglichen Ausweg aus dem Dilemma der histologischen Zottenklassifizierung vorgeschlagen haben. Welchen Mehrwert diese objektivere Zottenklassifizierung auf immunhistochemischer Basis für die Diagnostik der pathologischen und normalen Plazenta noch entfalten kann, liegt jedoch jenseits der Reichweite der vorliegenden Studie an ausschließlich normalen Plazenten soll aber in zukünftigen Studien ergänzt werden. Allerdings werden über die Nomogramme (Abbildung 14) Fallzahlabeschätzungen für zukünftige Studien unterstützt.

Von Bedeutung ist darüber hinaus auch die Frage, ob die vorliegende Sammlung von Plazenten tatsächlich die Charakteristika aufweist, die von einer Stichprobe normaler und klinisch unauffälliger Plazenten erwartet werden können. Einfach und direkt vergleichbare Daten liegen dabei besonders für die makroskopischen Analysen vor. Diese Vergleiche zeigen, dass die vorliegende Plazentasammlung als eine typische Normalpopulation angesehen werden kann. Als Beispiel seien hier die Gewichtsdaten der Plazenten aufgeführt, für die sich eine ganze Reihe normaler Vergleichswerte finden lassen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich des ermittelten Plazentagewichts zu bisher veröffentlichten Daten.

Eigene Untersuchung	Literaturdaten
	Aherne et al. 1966: Plazentavolumen 488 ± 90 ml (entspricht 488 ± 90 g bei $\rho = 1$ g/ml)
	Boyd 1984: Plazentavolumen 500 ± 12 ml (entspricht 500 ± 12 g bei $\rho = 1$ g/ml)
	Ali et al. 1996: PG = $524,4 \pm 76$ g
	Almasry et al. 2012: PG = $532,8 \pm 56,4$ g

5.4. Intraplazentare Variabilität mikroskopischer Parameter

Bei der stereologischen Untersuchung von biologischen Proben muss ein angemessener Mittelweg zwischen Aufwand und erzielbarer Genauigkeit gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit variierten die bestimmten Volumina der mikroskopisch untersuchten Strukturen zwischen den einzelnen Gewebeproben innerhalb einer Plazenta beträchtlich (vgl. Tabelle 5). Diese hohe intraplazentare Variabilität ist in diesem Organ nicht ungewöhnlich [Benirschke et al., 2012] und spiegelt die Notwendigkeit der Untersuchung mehrerer Gewebeproben einer Plazenta wieder [Schmitz, 1998]. In der vorliegenden Studie wurde dieser intraplazentaren Variabilität durch „systematic random“ sampling von 6 Proben jeder Plazenta Rechnung getragen. Damit ist ein ausreichender Datenpool entstanden, in dem Faktoren, welche die intraplazentare Variabilität beeinflussen, gesucht werden können. Post-hoc, d.h. nach der „systematic random“ Probengewinnung wurden die Probenentnahmestellen nachkartiert und dabei die Entfernung von der Nabelschnur und dem Plazentarand der Proben bestimmt.

Unterschiede im Verteilungsmuster der Volumina von Stroma, Gefäßlumen, Gefäßendothel und Synzytium Aktin positiver und negativer Zotten, sowie Fibrinoid und intervillöser Raum wurden untersucht und in Abhängigkeit von ihrer Lage zum Rand und zur Nabelschnurinsertion der Plazenta betrachtet. Dabei wurde festgestellt, dass es eine signifikante Zunahme des Volumens der Gefäßlumina Aktin negativer Zotten mit zunehmendem Abstand zum Rand der Plazenta gibt. Diese Gefäße sind

nicht von einer PVSM umgeben. Eine intensivere Kapillarisation und Verzweigung des Zottenbaumes in zentralen Bereichen der Plazenta könnte der Hintergrund dieses Phänomens sein. Das weist auch darauf hin, dass diese zentralen Bereiche für den Stoffaustausch und die Leistung der Plazenta eine besondere Bedeutung haben könnten. Dazu passt, dass auch das Volumen des intervillösen Raumes mit zunehmender Entfernung der entnommenen Gewebeprobe zum Rand zunimmt. Die Plazenta wird also in ihrem mittleren Bereich nicht nur intensiver kapillarisiert, sondern auch stärker von mütterlichem Blut gespeist. Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Studie Befunde erhoben werden, die darauf hinweisen, dass am Rand der Plazenta ein anderes, weniger intensiv dem Stoffaustausch dienendes Milieu herrscht als in zentralen Abschnitten der Plazenta.

Die übrigen Parameter wie Stroma, Gefäßendothel und Synzytium Aktin positiver und negativer Zotten, Gefäßlumen Aktin positiver Zotten und Fibrinoid sind homogen über die gesamte Plazenta verteilt. Sie zeigen keine signifikanten Zusammenhänge in Abhängigkeit von ihrer Lage, weder zur Nabelschnurinsertion noch zum Rand der Plazenta. Der Zottenbaum und hier vor allem der Aktin positive Anteil erstreckt sich als Rückgrat der Zottenarchitektur über die gesamte Plazenta. In Plazenten klinisch unauffälliger Schwangerschaften findet sich daher eine diskrete, aber nachweisbare Abhängigkeit der Variabilität von der Zentralität der Entnahmeposition der hier untersuchten Parameter. Allerdings ist ein Großteil der in dieser Arbeit gefundenen Variabilität von der Entnahmeposition unabhängig. Obwohl positionsabhängige Einflüsse nur gering sind, sind sie nachweisbar; „Systematic random sampling“ bei der Probengewinnung für quantitative Analysen der menschlichen Plazenta bleibt daher unverzichtbar.

5.5. Korrelationen zwischen verschiedenen mikroskopischen Parametern

Anhand der statistischen Korrelationsanalyse der mikroskopischen Strukturen konnte gezeigt werden, dass einzelne Strukturen des Zottenbaumes in ihrem Vorkommen miteinander korrelieren. Dabei zeigte sich, dass sowohl Zusammenhänge von Strukturen innerhalb einer Gruppe (SUposZO und Unterelemente davon; SUNegZO

und Unterelemente davon) als auch zwischen den beiden Summenparametern auftreten. Mit steigender Anzahl an Aktin positiven Zotten in einer Plazenta, steigen auch die Volumina der einzelnen Strukturen der Aktin positiven Zotte an. Das gleiche gilt für Aktin negative Zotten. Das ist nicht unerwartet.

Auffällig ist aber, dass die wesentlichen und volumenstärksten Parameter der Aktin positiven Zotten (SUposZO und posSTRO) statistisch signifikant negativ mit den analogen Parametern (SUnegZO und negSTRO) Aktin negativer Zotten korrelieren (siehe Abbildung 8). Das zeigt, dass es Zusammenhänge zwischen diesen beiden Zonen unterschiedlicher Stromaentwicklung gibt. Der Aktin positive Anteil des Zottenbaumes und sein Volumenanteil expandieren also zumindest teilweise auf Kosten des Aktin negativen Anteiles bzw. vice versa. Es ist keineswegs so, dass diese beiden Unterbestandteile stets symmetrisch wachsen. Hier gibt es Verschiebungen der Anteile beim Wachstum einer Plazenta, deren Analyse allerdings weiterer Studien bedarf.

Die statistisch positive Korrelation von Fibrinoid (FIB) mit SUposZO und posSTRO, d.h. mit den Aktin positiven Zotten, unterstreicht deutlich, dass die klassischen Stammzotten in die Aktin positive Population einbezogen sind. Es ist bekannt [Kaufmann et al., 1996], dass sich vor allem an der Oberfläche der Stammzotten Fibrinoid ablagert, das dort teilweise den schon degenerierten Trophoblasten ersetzen kann. An dieser Stelle im Zottenbaum handelt es sich typischerweise um sogenanntes Fibrin-Typ Fibrinoid, das als Gerinnungsablagerung aus dem mütterlichen Blut betrachtet werden kann und hier bereits befindliche Trophoblast-Defekte deckt. Generell besteht Fibrinoid aus heterogenem Material, wie zellulären Sekreten und degenerierten Zellen [Benirschke und Kaufmann, 2000] und tritt vorwiegend im Bereich von Stammzotten auf [Nelson, 1996; Kaufmann et al., 2004], was mit Daten dieser Studie im Einklang ist.

5.6. Korrelation mikroskopischer Parameter mit makroskopischen Parametern

Das makroskopische Erscheinungsbild der Plazenta ist ein wichtiger Faktor, der als Korrelat der intrauterinen Situation gelten kann, aus der sich ein gesunder Fetus und

später auch ein gesundes Kind entwickeln kann [Hemachandra et al., 2006; Risnes et al., 2009]. Plazentagewicht und Kindsgewicht sind relativ eng aneinander gekoppelt, so dass hohe (bzw. niedrige) Plazentagewichte und hohe (bzw. niedrige) Kindsgewichte gleichsinnig schwanken. Abweichungen der sogenannten fetoplazentaren Gewichtsrelation sind stets Zeichen für eine schwere pathologische Störung.

Die vorliegende Studie erlaubt es nun, Aussagen darüber zu treffen, welche mikroskopischen Anteile der Plazenta wesentliche Regulatoren des Plazentagewichts sind, nämlich die Aktin positiven Anteile der Plazenta. Für die Aktin negativen Zottenabschnitte und ihr Volumen findet sich keine signifikante Korrelation mit dem Plazentagewicht. Die Tatsache, dass sich eine sehr ausgeprägte positive Korrelation des Volumens aller Zotten (SUZO) mit dem Plazentagewicht findet, macht in der Gesamtübersicht klar, dass diese Korrelation tatsächlich ganz wesentlich von den Aktin positiven Zottenelementen getrieben wird. Es muss an dieser Stelle späteren und epidemiologisch orientierten Studien überlassen bleiben, ob die Assoziationen von Plazentagewicht und postnatalen Entwicklungsverzögerungen bzw. Erkrankungsmustern dann ebenfalls von den Aktin positiven Zotten mitbestimmt werden. Die vorliegende Studie macht eine Hypothesenbildung in diese Richtung jedenfalls möglich. Diese Beobachtung ist tatsächlich überraschend, weil die Aktin negativen Zottenbestandteile ja eigentlich diejenigen sind, in denen die größten Austauschkapazitäten der Plazenta erwartet werden müssen, sie liegen am weitesten peripher im Zottenbaum. Allerdings korrelieren Volumina dieser Aktin negativen Zottenanteile wiederum negativ mit den Aktin positiven Zottenbestandteilen. Insgesamt ergibt sich hier die Frage, ob weiterführende Studien auf Basis adäquat geschätzter Fallzahlen, wie Sie diese Studie ebenfalls zur Verfügung stellt, die Zusammenhänge in dem offensichtlich wichtigen Dreieck PG, SUposZO und SUnegZO weiter erhellen können. Das ist insbesondere für Studien im Rahmen des sogenannten „prenatal programming“ von Bedeutung. Hier liegen viele epidemiologische Daten vor, nach denen PG ein wesentlicher Indikator für lebenslang postnatal auftretende Erkrankungsrisiken darstellt. Bisher konnte noch kein quantitativ mikroskopischer Bestandteil direkt mit PG korreliert werden. Die Daten der vorliegenden Studie erlauben hier die Bildung von Hypothesen, die in weiteren Studien validiert werden können.

Schwerere Plazenten sind meist auch Plazenten mit einer größeren Dicke; jedenfalls ist dieser Zusammenhang gut bekannt und schon mehrfach beschrieben worden (für Referenzen s. Haeussner et al. [2014], für Übersichten Benirschke et al. [2012]). Bei der Dicke der Plazenta fällt auf, dass ebenfalls die Aktin positiven Zottenanteile (im besonderen SUposZO bzw. posSTRO) die wesentlichen Triebfedern der Korrelation sind. Die Aktin negativen Zottenbestandteile (hier repräsentiert durch SUnegZO und negSTRO) haben dagegen sogar eine Vorzeichenumkehr zu verzeichnen. Sie korrelieren im Trend negativ, wenn auch nicht statistisch signifikant, mit der Dicke der Plazenten. Die Dicke der Plazenten wird also allein durch die Aktin positiven Zottenanteile bestimmt.

Das Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht ist ein grobes Maß, das die Frage beantwortet, wie viel Gramm Plazenta benötigt wurden, um eine Gewichtseinheit des Fetus zu ernähren. Dieses Maß kann also zur Abschätzung der nutritiven Effizienz der Plazenta genutzt werden [Hayward et al., 2016]. Es nimmt mit steigendem intervillösen Raum zu (Abbildung 12 (C), $p < 0,001$) und korreliert – hier allerdings vorgegeben durch seine Berechnung – mit dem Plazentagewicht. Analysiert man die Zottenbestandteile, die hier an den Korrelationen beteiligt sind weiter, so ist eine sehr deutliche Korrelation mit dem Gesamtvolumen aller Zotten (SUZO) gegeben. Auch dies erklärt sich zwanglos. Je mehr Zotten vorhanden sind, umso mehr Volumen im intervillösen Raum ist auch von diesen Zotten umschlossen. Es fällt allerdings – ähnlich wie oben bereits für das Plazentagewicht diskutiert – auf, dass das Stroma Aktin positiver Zotten ebenfalls positiv und statistisch signifikant mit diesem Parameter korreliert. Daraus wird deutlich, dass der Beitrag des Aktin positiven Stromas zur Gesamtfunktion der Plazenta möglicherweise höher sein könnte, als bisher vermutet.

5.7. Einfluß des kindlichen Geschlechts und des Entbindungsmodus auf die mikroskopischen Parameter

Ein wesentlicher Faktor, der Einfluss auf die mikroskopischen Daten haben könnte, ist der Geburtsmodus (vaginal bzw. sectio caesarea). Durch das Pressen der Mutter und die Wehen während der Geburt werden die Bluträume der Plazenta komprimiert, und

das darin befindliche Blut teilweise ausgetrieben, wodurch Veränderungen im Volumenanteil der Gefäßlumina und des intervillösen Raumes der Plazenten beobachtet werden konnten. Bei sectio Geburten ist der Volumenanteil des Gefäßlumens Aktin negativer Zotten sowie der Volumenanteil des intervillösen Raumes signifikant höher als bei vaginaler Geburt. Erstaunlicherweise wurde das Gefäßlumen von Aktin positiven Zotten durch den Geburtsmodus nicht beeinflusst (siehe Kapitel 4.3.1). Dies könnte jedoch durch deren Lage im Zottenbaum begründet sein. Wird Blut aus der Plazenta gepresst, sollte es zunächst aus den Terminal- bzw. Intermediärzotten in die Stammzotten fließen, bevor es die Plazenta verlässt. Eine Abnahme der Volumina von Gefäßlumen Aktin positiver Zotten, sollte demnach erst bei sehr großen Volumenverschiebungen auftreten.

Auch auf die makroskopischen Parameter der Plazenta hat der Geburtsmodus einen entscheidenden Einfluss. So konnte gezeigt werden, dass das Gewicht und die Dicke der Plazenta vom Geburtsmodus signifikant beeinflusst ($p < 0,001$, Daten sind nicht gezeigt) werden. Auch das Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht (PG_GG_ratio) steigt bei sectio Geburten signifikant an ($p < 0,001$, Daten sind nicht gezeigt). Diese Zusammenhänge lassen sich ebenfalls durch ein erhöhtes Blutvolumen in der Plazenta bei Geburt durch sectio erklären. Bei der Bewertung des Plazentagewichts, der Dicke der Plazenta, sowie dem Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht muss daher immer auch der Geburtsmodus berücksichtigt werden.

Ein weiterer Aspekt, der das Blutvolumen innerhalb der Plazenta nach Geburt beeinflussen kann, ist die Art der Abnabelung durch den geburtsbegleitenden Arzt. Das Blut der Nabelschnur kann je nach Geburtsmodus, Zustand des Kindes und habitueller Handhabung durch den geburtsbegleitenden Arzt in Richtung Kind, in Richtung Plazenta oder gar nicht ausgestrichen werden. Da keine Daten über die Abnabelung vorliegen, bleiben die Auswirkungen der Abnabelung auf die mikroskopischen und makroskopischen Parameter der Plazenta unklar. Dies sollte in weiteren Untersuchungen evaluiert werden.

Das Geschlecht des Kindes besaß auf keinen der untersuchten mikroskopischen, sowie makroskopischen Parameter der Plazenta einen signifikanten Einfluss. Die Plazenten von weiblichen und männlichen Kindern unterscheiden sich daher weder

mikroskopisch noch makroskopisch in einem bei dieser Stichprobengröße relevanten Ausmaß.

5.8. Fallzahlabschätzungen für zukünftige Studien

Die vorliegende Studie beschäftigt sich nur mit normalen Plazenten. Aber natürlich ist es beabsichtigt, die hier vorgestellte neuartige Unterteilung des Zottenbaumes in Aktin positive und Aktin negative Elemente an pathologischen Plazenten anzuwenden und dann vergleichend mit Normalpopulationen zu untersuchen. Hierfür sind Abschätzungen sinnvoller Fallzahlen hilfreich, die eine ausreichend hohe Sicherheit bieten, einen erwarteten Unterschied zwischen diesen Gruppen auch tatsächlich statistisch signifikant nachweisen zu können. Auch ist es für retrospektive Beurteilung publizierter Arbeiten von Bedeutung, ob die dort verwendeten Fallzahlen überhaupt groß genug waren, um vorhandene Unterschiede zu finden. Solche Fallzahlabschätzungen sind bisher in der Literatur nicht explizit publiziert worden. Die in Abbildung 14 gezeigten Nomogramme umfassen daher alle wesentlichen makroskopischen und mikroskopischen Parameter der vorliegenden Studie und unterstützen sowohl retrospektive Analyse, wie auch prospektive Planung. Bei der retrospektiven Analyse fällt auf, dass die in den Nomogrammen ausgewiesenen Fallzahlen für diskrete Unterschiede (5 - 10% relative Mittelwertdifferenz dMW [%]) einiger mikroskopischer, aber auch einiger makroskopischer Parameter bereits Gruppengrößen im Bereich von 100 und mehr Plazenten liegen. In vielen morphometrischen oder stereologischen Studien (z.B. [Sagol et al., 2002; Guiot et al., 2003; van Patot et al., 2009; Almasry et al., 2012; Jirkovska et al., 2012; Wikstrom et al., 2012; Saha et al., 2014 , ,]) wurden Fallzahlen kleiner als $n = 100$ pro Gruppe (vielfach auch kleiner als $n = 10$) berichtet. Möglicherweise konnten daher nur sehr drastische Effekte entdeckt und beschrieben werden. Außerdem ist auffällig, dass die makroskopischen Parameter für solche Gruppenvergleiche im Allgemeinen mit kleineren Fallzahlen auskommen als die mikroskopisch erhobenen Parameter. Dies ist möglicherweise der Grund dafür, warum in vielen Studien zum „prenatal programming“ bisher die makroskopischen Daten die wesentlichen plazenta-bezogenen Datengrundlagen bleiben [Burton et al., 2011]. Mikroskopisch bestimmte Daten wären

zwar möglicherweise funktionell aussagekräftiger als makroskopische, streuen aber offensichtlich stärker, benötigen daher höhere Fallzahlen und sind mit deutlich höherem Aufwand und Kosten bei der Studiendurchführung verbunden.

6. Literaturverzeichnis

Aherne WMD, Path MC, Dunnill MS. Morphometry of the human placenta. Br med bull 1966; 22(1): 5 – 8.

Ali KZM, Burton GJ, Morad N, Ali ME. Does hypercapillarization influence the branching pattern of terminal villi in the human placenta at high altitude? Placenta 1996; 17(8): 677 – 682.

Almasry SM, Eldomiaty MA, Elfayomy AK, Habib FA, Safwat MD. Structural analysis of human placental stem and terminal villi from normal and idiopathic growth restricted pregnancies. J Mol Hist 2012; 43: 263 – 271.

Barker DJP, Eriksson JG, Alwasel SH, Fall CHD, Roseboom TJ, Osmond C. The maternal and placental origins of chronic disease. In: Burton GJ, Barker DJP, Moffett A, Thornburg K. The placenta and human development programming. Cambridge University Press, Cambridge 2011.

Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the Human Placenta. 4 th ed. Springer, Berlin 2000.

Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. Springer, Berlin 2006.

Benirschke K, Burton G, Baergen RN. Pathology of the human placenta. 6. Aufl. Springer, Berlin 2012.

Boyd JD, Hamilton WJ. The human placenta. W. Heffer and sons, Cambridge 1970.

Boyd PA. Quantitative structure of the normal human placenta from 10 weeks of gestation to term. Early Hum Dev 1984; 9: 297 – 307.

- Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* London 1999; 181(3): 718 – 124.
- Burton GJ, Graham J, Watson AL, Adrian L, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(6), 2954 – 2959.
- Burton G, Barker D, Moffett A, Thornburg K. The placenta and human developmental programming. Cambridge University Press, Cambridge 2011.
- Castellucci M, Schweikhart G, Kaufmann P, Zaccheo D. The stromal architecture of the immature intermediate villus of the human placenta. Functional and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest* 1984; 18(2): 95 – 99.
- Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, Kaufmann P. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryol (Berl.)* 1990; 181(2): 117 – 128.
- Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: Fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 2000; 6(5): 485 – 494.
- Del Nero U, Rudge MVC, Novo, NF, Calderon IMP, Brasil MAM. Methodology to study the volume and absolute placental density in human placenta at term. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2002; 24(10): 212 – 216.
- Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Technique* 1997; 38: 29 – 41.
- Egbor MT, Ansari T, Morris N, Green CJ, Sibbons PD. Preclampsia and fetal growth restriction: How morphometrically different is the placenta? *Placenta* 2006; 27(6-7): 727 – 734.

Enders AC, King BF. Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey. *Am J Anat* 1988; 181(4): 327 – 340.

Enders AC. Trophoblast differentiation during the transition from trophoblastic plate to lacunar stage of implantation in the rhesus monkey and human. *Am J Anat* 1989; 186(1): 85 – 98.

Enders AC, Lantz KC, Peterson PE, Hendrickx AG. From blastocyst to placenta: the morphology of implantation in the baboon. *Human reproduction update* 1997; 3 (6): 561 – 573.

Frank H-G. Placental Development. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, . *Fetal and Neonatal Physiology*. 5th edition, Elsevier, München 2016.

Frank HG. Placenta and intrauterine development. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH. *Fetal and neonatal physiology*. 4th edition. Elsevier, München 2011.

Gill JS, Woods MP, Salafia CM, Vvedensky DD. Probability distributions for measure of placental shape and morphology. *Physiol Meas* 2014; 35(3): 483 – 500.

Graf R, Langer JU, Schönfelder G, Oney T, Hartel-Schenk S, Reutter W, Schmidt HH. The extravascular contractile system in the human placenta. Morphological and immunocytochemical investigations. *Anat Embryol* 1994; 190: 541 – 548.

Graf R, Schönfelder G, Mühlberger M, Gutschmann M. The perivascular contractile sheath of human placental stem villi: Its isolation and characterization. *Placenta* 1995a; 16(1): 57 – 66.

Graf R, Neudeck H, Gossrau R, Vetter K. Elastic fibres are an essential component of human placental stem villous stroma and an integrated part of the perivascular contractile sheath. *Cell Tissue Res* 1995b; 283(1):133 – 141

- Graf R, Neudeck H, Gossrau R, Vetter K. Elastic fibres are an essential component of human placental stem villous stroma and an integrated part of the perivascular contractile sheath. *Cell Tissue Res* 1996; 283(1): 133 – 141.
- Graf R, Matejevic D, Schuppan D, Neudeck H, Shakibaei M, Vetter K. Molecular anatomy of the perivascular sheath in human placental stem villi: the contractile apparatus and its association to the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 1997; 290(3): 601 – 607.
- Guiot C, Russo R, Sciarrone A, Biolcati M, Piccoli E, Kaufmann P, Todros T. Investigation of placental stem villi arteries in fetally growth-restricted pregnancies: a multivariate analysis. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 55: 32 – 36.
- Haeussner E, Schmitz C, von Koch FE, Frank HG. Birth Weight correlates with size but not shape of the normal human placenta. *Placenta* 2013; 34(7): 574 – 582.
- Haeussner E, **Buehlmeier A**², Schmitz C, von Koch FE, Frank HG. Novel 3D microscopic analysis of human placental villous trees reveals unexpected significance of branching angles. *Sci Rep* 2014; 4: 6192.
- Haeussner E, Aschauer B, Burton J, Huppertz B, Edler von Koch F, Müller-Starck J. Does 2D-Histologic identification of villous types of human placentas at birth enable sensitive and reliable interpretation of 3D structure? *Placenta* 2015; 36(12), 1425 – 1432.
- Hayward CE, Lean S, Sibley CP, Jones RL, Wareing M, Greenwood SL, Dilworth MR. Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio? *Front Physiol* 2016; 7: 28.
- Hemachandra AH, Klebanoff MA, Duggan AK, Hardy JB, Furth SL. The association between intrauterine growth restriction in the full-term infant and high blood pressure at age 7 years: results from the Collaborativa Perinatal Project. *Int J Epidemiol* 2006; 35(4): 871 – 877.

² Dieser Artikel entstand zum Teil aus den Daten dieser Arbeit. Die Autorin dieser Promotionsarbeit war in diesem Artikel als Zweitautor tätig.

- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology. 2nd edition. QTP Publications, Liverpool 2010.
- Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998; 110 (5): 495 – 508.
- Jirkovska M, Kucera T, Kalab J, Jadrnicek M, Niedobova V, Janacek J, Kubinova L, Moravcova M, Zizka Z, Krejci V. The branching pattern of villous capillaries and structural changes of placental terminal villi in type 1 diabetes mellitus. *Placenta* 2012; 33: 343 – 51.
- Kaufmann P, Sen DK, Schweikhart G. Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res* 1979; 200: 409 – 423.
- Kaufmann P, Bruns U, Leiser R, Luckhardt M, Winterhager E. The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. *Anat Embryol (Berl.)* 1985a; 173(2): 203 – 214.
- Kaufmann P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. *Contrib Gynecol Obstet* 1985b; 13: 5 – 17.
- Kaufmann P, Luckhardt M, Leiser L. Three-dimensional representation of the fetal vessel system in the human placenta. *Trophoblast Res* 1988; 3: 113 – 137.
- Kaufmann P. Placentation und Placenta. In: Klaus V. Hinrichsen (Hg.): *Humanembryologie*. Springer Verlag, Berlin 1990.
- Kaufmann P, Huppertz B, Frank HG. The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *Ann Anat* 1996; 178: 485 – 501.
- Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspect of the human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004; 25(2-3): 114 – 126.

- Kimber SJ, Spanswick C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Semin Cell Dev Bio* 2000; 11(2): 77 – 92.
- Kohnen G, Castellucci M, His BL, Yeh CJ, Kaufmann P. The monoclonal antibody GB 42-a useful marker for differentiation of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1995; 281(2): 231 – 241.
- Kohnen G, Kertschanska S, Demir R, Kaufmann P. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol* 1996; 105(6): 415 – 429.
- Luckhardt M, Leiser R, Kingdom J, Malek A, Sager R, Kaisig C, Schneider H. Effect of physiologic perfusion-fixation on the morphometrically evaluated dimensions of term placental cotyledon. *J Soc Gynecol Invest* 1996; 3(4): 166 – 171.
- Mayhew TM, Jackson MR, Boyd PA. Changes in oxygen diffusive conductance of human placentae during gestation (10 – 41 weeks) are commensurate with gain in fetal weight. *Placenta* 1993; 14(1): 51 – 61.
- Mayhew T. M. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol* 2001; 16(4): 1213 – 1224.
- Mayhew TM. Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. *Placenta* 2002; 23(10): 742 – 750.
- Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta* 2003; 24(2-3): 219 – 226.
- Mayhew TM. Stereology and the placenta: where's the point? – a review. *Placenta* 2006; 27(Suppl A 20): 17 – 25.

- Moll W, Nienartowicz A, Hess H, Wrobel K-H, Lenz A. Blood flow regulation in the uteroplacental arteries. *Trophoblast Res* 1988; 3: 83 – 96.
- Mulisch M, Welsch U. Romeis Mikroskopische Technik. 18. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010.
- Nelson DM. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta* 1996; 17(7): 387 – 391.
- Quester R, Schröder R. The shrinkage of the human brain stem during formalin fixation and embedding in paraffin. *J Neurosci Methods* 1997; 75: 81 – 89.
- Risnes KR, Romundstad PR, Nilsen TIL, Eskild A, Vatten LJ. Placental weight relative to birth weight and long-term cardiovascular mortality: findings from a cohort of 31,307 men and women. *Am J Epidemiol* 2009; 170(2): 622 – 631.
- R Core Team: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Wien 2013. Online verfügbar unter <http://www.R-project.org/>.
- Sadler TW. Medizinische Embryologie. 11. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008.
- Sagol S, Sagol O, Ozdemir N. Stereological quantification of placental villus vascularization and its relation to umbilical artery Doppler flow in intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 2002; 22: 398 – 403.
- Saha S, Biswas S, Mitra D, Adhikari A, Saha C. Histologic and morphometric study of human placenta in gestational diabetes mellitus. *Ital J Anat Embryol* 2014; 1 – 9
- Schmitz C. Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat Embryol* 1998; 198: 371.

- Schmitz C, Frank HG. Discrete Placental Dysfunction: The Overlooked Player in Prenatal Roots of Neuropsychiatric Diseases? *Neuroembryology* 2002; 1: 169 – 75.
- Sen DK, Kaufmann P, Schweikhart G. Classification of human placental villi. II. Morphometry. *Cell Tissue Res* 1979; 200(3): 425 – 435.
- Sibley CP, Bauman KF, Firth JA. Permeability of the foetal capillary endothelium of the guinea-pig placenta to heam proteins of various molecular sizes. *Cell Tissue Res* 1982; 223: 165 – 178.
- Sibley CP, Bauman KF, Firth JA. Molecular charge as a determinant of macromolecule permeability across the fetal capillary endothelium of the guinea-pig placenta. *Cell Tissue Res* 1983; 229(2): 356 – 377.
- Thompson E. Quantitative microscopic analysis. *J Geol* 1930; 38(3): 193 – 222.
- van Patot, M C Tissot, Valdez M, Becky V, Cindrova-Davies T, Johns J, Zwerdling L, et al. Impact of pregnancy at high altitude on placental morphology in non-native women with and without preeclampsia. *Placenta* 2009; 30: 523 – 528.
- Wikstrom SE, Thorsell M, Ostlund E, Blomgren B, Marschall H. Stereological assessment of placental morphology in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Placenta* 2012; 33: 914 – 918.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Frank, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Durch seine fachliche Führung und stete Bereitschaft für einen wissenschaftlichen und persönlichen Austausch stand er mir immer zur Seite.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Eva Haeussner für die vorbildliche fachliche und persönliche Betreuung während dem experimentellen und auch schriftlichen Teil dieser Dissertation. Danke für die unzähligen Stunden, in denen wir zusammen über die Daten und die Arbeit gesprochen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Team des Lehrstuhl II der Anatomischen Anstalt der LMU unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Christoph Schmitz bedanken, das diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Einen speziellen Dank möchte ich auch an die Mütter richten, die ihre Plazenten zum Dienste dieser wissenschaftlichen Studien zur Verfügung gestellt haben. Auch möchte ich den Krankenschwestern, Hebammen und Ärzten der Station Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Dritter Orden unter Leitung von Herrn Dr. Franz Edler von Koch für ihre vorbildliche Arbeit danken.

Natürlich geht mein Dank auch an meine Familie und Freunde, die mich in mancher schwierigeren Phase durch ihren steten Zuspruch begleitet haben. Besonders möchte ich meinen Dank an meinen Mann Stephan richten, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die zahlreichen Korrekturlesungen, die Zeit und Hilfe die du mir geschenkt hast.

Auch meinem lieben Sohn Felix möchte ich danken. Der mir auch auf Durststrecken immer wieder neue Kraft gibt und mich täglich neu motiviert, immer mein Bestes zu geben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich durch ihre liebevolle Erziehung und stete Unterstützung in meinem Lebensweg begleitet haben und immer noch begleiten. Danke, dass Ihr mir das alles ermöglicht habt.

8. Eidesstattliche Versicherung

Bühlmeyer, Antonia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Stereologische Volumenbestimmung immunhistochemisch differenzierter Strukturbestandteile der menschlichen Plazenta

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Schondorf, den 11.06.2018

Ort, Datum

Antonia Bühlmeyer

Unterschrift Doktorandin/Doktorand
